

**PROLIFERATION UND HISTOCHEMISCHE
ENZYMAKTIVITÄT NORMALER UND
PRAENEOPLASTISCHER ZELLPOPULATIONEN
IN DER LEBER WÄHREND DER
DIÄTHYLNITROSAMININDUZIERTEN
CARCINOGESE**

Peter Scholze

1972

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

PROLIFERATION UND HISTOCHEMISCHE ENZYMAKTIVITÄT
NORMALER UND PRAE NEOPLASTISCHER ZELLPOPULATIONEN
IN DER LEBER WÄHREND DER DIÄTHYLNITROSAMIN-
INDUZIERTEN CARCINOGENESE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Peter Scholze
aus Berlin

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München.

Berichterstatter: Professor Dr. Hartut Rabes
Mitberichterstatter: Professor Dr. Max Eder
Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1972.



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Für Anleitung und Unterstützung danke ich Herrn
Professor Dr. H. Rabes und Herrn Dr. H.V. Tuzcek
sowie Herrn Dr. R. Hartenstein, Herrn H.G. Wese-
mann, Frau E. Hajok, Fräulein R. Kerler und Frau
M. Kirkpatrick.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller
Unterstützung der Deutschen Forschungsgemein-
schaft (Ra 101/11) durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. ALLGEMEINER TEIL

- I. Vorbemerkungen zur Wirkungsweise des Diäthyl-
nitrosamins (DÄNA). 1
1. Metabolismus
 2. Dosis-Wirkungs-Beziehung
 3. Morphologie der Leber
 4. Proteinstoffwechsel
 5. Nukleinsäurestoffwechsel
 6. Glykogen
 7. Zelluläre Angriffspunkte
 - a. Cytoplasmatische Angriffspunkte
 - b. Nukleäre Angriffspunkte.
- II. Allgemeine Fragestellung und Skizzierung des
Versuchsmodells. 18

B. EXPERIMENTELLER TEIL

- I. Inkorporation von ^3H -Thymin in die Hepato-
cyten der ruhenden und der regenerierenden
Leber während der Diäthylnitrosamin-induzier-
ten Carcinogenese nach Pulsmarkierung.
1. Proliferationsaktivität und ^3H -Thymin-
Markierungsindex (TdR- ^3H -MI). 19
 2. Literaturübersicht. 20
 3. Material und Methode. 22
 - 3.1. Der TdR- ^3H -MI in der ruhenden Leber
 - 3.2a. Der TdR- ^3H -MI in der regenerierenden
Leber
 - 3.2b. Topik der markierten Hepatocyten in
der regenerierenden Leber

3.2c. DNS-Synthesewelle in der regenerierenden Leber am 72. Fütterungstag

Mikroskopische Auswertung

4. Statistik.	26
5. Ergebnisse.	27
5.1. Der TdR- ³ H-MI in der ruhenden Leber	
5.2a. Der TdR- ³ H-MI in der regenerierenden Leber	
5.2b. Topik der markierten Hepatocyten in der regenerierenden Leber	
5.2c. DNS-Synthesewelle in der regenerierenden Leber am 72. Fütterungstag	
5.3. Hyperbasophile Bezirke.	
6. Diskussion.	29
6.a. Versuch einer Stadieneinteilung der DÄNA-induzierten Carcinogenese	
6.b. Eigene Beurteilung der Versuche.	
Tabellen.	33
Abbildungen.	37

II. Histochemische Aktivität der Adenosin-Triphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase im Leberparenchym während der DÄNA-induzierten Carcinogenese.

1. Vor- und Nachteile histochemischer Untersuchungen.	50
2. Charakteristik der Adenosin-Triphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase.	50
3. Literaturübersicht.	51
4. Fragliche Spezifität der enzymdefizienten Inseln.	53
5. Fragen zur Wachstumskinetik der Inseln.	53

6. Material und Methode.	54
7. Ergebnisse.	57
7.1. Einfluß einer 60-stündigen Regeneration auf die Wachstumskinetik der Inseln.	
7.2. Zeitliches Auftreten von Straßen und Inseln	
7.3. Inselzahl je Flächeneinheit zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese	
7.4. Fläche der beiden größten Inseln zwischen 30. und 100. Tag der DÄNA-Carcinogenese	
7.5. Anteil der Inselfläche an der Gesamtfläche des Parenchyms zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese	
7.6. Häufigkeitsverteilung der Inseln entsprechend einzelner Größenklassen zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese.	
8. Diskussion.	60
8.1. Zur statistischen Auswertung von Serienschnitten	
8.2. Zur Abnahme der Inselzahl je Flächeneinheit in den späten Stadien der DÄNA-Carcinogenese	
8.3. Clonale Genese oder appositionelles Wachstum der Inseln	
8.4. Interpretation der Histogramme und Häufigkeitsfunktionen	
8.5. Weitere Argumente für und gegen die clonale Genese der Inseln (Literaturübersicht)	
8.6. Alternativmodelle zur clonalen Hypothese	
8.7. Höhere Regulationsmechanismen und Inselwachstum	
8.8. Fraglicher kausaler Zusammenhang von Inseln und DÄNA-Carcinogenese.	
Tabellen.	67
Abbildungen.	76

III. Inkorporation von ^3H -Thymidin in Gesamtparenchym und Bezirke mit Defekt der histochemischen Adenosin-Triphosphatase-Aktivität in der ruhenden und regenerierenden Leber nach mehrfacher Markierung während der DÄNA-induzierten Carcinogenese.	
1. Zum Nukleinsäurestoffwechsel in hyperplastischen Knötchen, hyperbasophilen Bezirken und Inseln (Literaturübersicht.	82
2. Vorteile einer mehrfachen Markierung.	83
3. Material und Methode.	83
4. Ergebnisse.	85
4.1. Der TdR- ^3H -MI von Gesamtparenchym und Bezirken mit Defekt der histochemischen Adenosin-Triphosphatase-Aktivität in der ruhenden Leber	
4.2. Der TdR- ^3H -MI von Gesamtparenchym und Bezirken mit Defekt der histochemischen Adenosin-Triphosphatase-Aktivität in der regenerierenden Leber	
4.3. Versuch einer differenzierteren Auswertung verschiedener Inselbereiche sowie einer selektiven Auswertung von Inseln unterschiedlicher Größe	
4.4. Zur Silberkorndichte.	
5. Diskussion.	87
5.1. "Dauerinfusion" und Wachstumsfraktion	
5.2. Versuch einer Stadieneinteilung der DÄNA-induzierten Carcinogenese aufgrund der Proliferationsaktivität in den Inseln	
5.3. Clon-Hypothese und Proliferationsaktivität in den Inseln	
5.4. Fragliche Bedeutung eines Blocks in der G ₂ -Phase	
5.5. Diskussion anderer Ursachen für die Abnahme der Silberkorndichte in den Inseln.	

Tabellen.	93
Abbildungen.	97

IV. Einfluß mehrerer Teilhepatektomien auf die Überlebenszeit DÄNA-gefütterter Ratten und auf die Wachstumskinetik der Bezirke mit histochemischem Verlust der Adenosin-Triphosphatase-Aktivität.

1. Literaturübersicht.	99
1.1. Regenerationskapazität der Leber	
1.2. Zeitlicher Ablauf der Regeneration nach einer 2/3-Hepatektomie	
1.3. Unterschwellige und überschwellige Leberregeneration	
1.4. Zur Überlebenszeit und dem Verhalten der Inseln nach einer 2/3-Hepatektomie während der DÄNA-Carcinogenese.	
2. Zur Versuchsplanung.	101
3. Material und Methode.	102
4. Ergebnisse.	106
4.1. Überlebenszeit der in einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0-bis 5-fach teilhepatektomierten Tiere	
4.2. Überlebenszeit der in einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0-bis 3-fach teilhepatektomierten Tiere	
4.3. Überlebenszeit der in einem späten Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0-bis 3-fach teilhepatektomierten Tiere	
4.4. Wachstumskinetik der ATPase-defizienten Inseln nach bis zu fünf, während einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese gesetzten Teilhepatektomien	
4.5. Gewichtszunahme der Rattenleber nach bis zu fünf aufeinanderfolgenden Teilhepatektomien	

- 4.6. Der TdR-³H-MI nach einem unter-schweligen Proliferationsreiz und mehrfacher Pulsmarkierung.

5. Diskussion. 109

- 5.1. Ausmaß der Wachstumsanregung nach den verschiedenen Teilhepatekto-mien
5.2. Die Überlebenszeit bestimmende Faktoren
5.3. Wachstumskinetik der Inseln in Ab-hängigkeit von der Stärke des Re-generationsreizes
5.4. Überlegung zur Bestimmung der Zell-cyclus-Phasen nach einem unter-schweligen Proliferationsreiz und "Dauermarkierungen" unterschiedli-cher Länge.

Tabellen. 112

Abbildungen. 116

V. Histologische und histochemische Bilder. 122

VI. Zusammenfassung. 127

VII. Literaturverzeichnis. 135

Abkürzungen. 152

A. ALLGEMEINER TEIL

I. VORBEMERKUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE DES DIÄTHYLNITROSAMINS.

Sämtliche Dialkylnitrosamine mit unverzweigten Ketten vom Dimethylnitrosamin (DMNA) bis hin zum Diamylnitrosamin induzieren hepatocelluläre Carcinome (Druckrey et al. 1961). Diäthylnitrosamin (DÄNA) zeichnet sich durch seine gute Wasserlöslichkeit aus. Von weiterem Vorteil für experimentelle Untersuchungen ist seine außerordentlich präzise Dosis-Wirkungs-Beziehung (Druckrey et al. 1963, Rajewsky et al. 1966). Artspezifität (Schmähl und Osswald 1967, Schmähl et al. 1967, Schmähl et al. 1968) und Organspezifität (Schmähl et al. 1960) können als Hinweise dafür angesehen werden, daß die aktive carcinogene Wirkform erst nach Veränderung des DÄNA-Moleküls im Organismus entsteht.

1. Metabolismus

Nach Druckrey et al. (1967) wird DÄNA im Organismus durch enzymatische Hydroxylierung zu einem hochreaktiven, kurzlebigen alpha-Hydroxy-Derivat metabolisiert, aus welchem über leicht hydrolysierbare und instabile Zwischenstufen ein Diazoalkan und (oder) ein Carbonium-Ion entstehen. Die beiden zuletzt genannten Substanzen sollen die aktiven carcinogenen Wirkformen darstellen. Der erste Schritt dieser Reaktionskette müßte durch alpha-Hydroxylasen eingeleitet werden, die restlichen Reaktionen könnten dann spontan ablaufen.

Von anderer Seite (Borek 1963) wurde den Methylasen eine entscheidende Bedeutung für den Metabolismus carcinogener

Substanzen zugeschrieben. Die Rattenleber besitzt auch ein aktives, mikrosomales N-Demethylasen-System (Brodie et al. 1955), auf dessen fragliche Bedeutung zumindest im DMNA-Metabolismus durch oxydatives Angreifen der N-Methylgruppe hingewiesen wurde (Brouwers und Emmelot 1960, Knecht 1966, Craddock 1969).

Für das dem DÄNA analoge DMNA sind einige formale Reaktionsprodukte auf ihre carcinogene Wirkung geprüft worden: Dimethylnitramin, das formale Oxydationsprodukt des DMNA, erzeugt bei hoher Dosierung höchstens cystische Leberveränderungen und in einigen Fällen Nierentumoren. N,N-Dimethylhydrazin, das formale Reduktionsprodukt, führt zu keinen Veränderungen in der Rattenleber. Ebenso fehlt dem N-Dimethylformamid, einer DMNA-isosteren Substanz, eine carcinogene Wirkung (Druckrey et al. 1961).

Auch die folgenden Befunde sprechen dafür, daß die aktive carcinogene Wirkform erst im DÄNA-Metabolismus entsteht: In niederen Organismen können die stabilen Nitrosamine im Gegensatz zu den instabilen Nitrosamiden, welche bereits in wässriger Lösung hydrolysieren, nicht abgebaut werden. Den Nitrosaminen fehlt dann aber auch carcinogene und mutagene Wirkung. So sind bei *Saccharomyces cervisiae* die Nitrosamine im Gegensatz zu den Nitrosamiden nicht mutagen (Marquardt et al. 1963). Auch in *Tetrahymena*-Kulturen bleiben Nitrosamine ohne Wirkung, während Nitrosamide den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel sowie den O_2 -Umsatz hemmen (Volm und Süß 1968). Ein weiterer Hinweis für eine "Giftung" des DÄNA ist die hohe Angehrate hepatocellulärer Carcinome (Schmähl et al. 1960), obwohl die Konzentration des Carcinogens nach oraler Applikation im Gastrointestinaltrakt am höchsten ist.

2. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Bei einer Dosierung mit geringer Toxizität hängt die carcinogene Wirkung im chronischen Versuch nicht von der Höhe der Einzeldosis ab, sondern von der Höhe der Gesamtdosis ("irreversible summation"). Diese zur Krebserzeugung erforder-

liche Gesamtdosis nimmt mit der Anzahl der C-Atome eines Dialkylnitrosamins stetig zu und beträgt für DMNA, DÄNA und Diamylnitrosamin 0.5, 0.7 bzw. 28.0 g/kg (Druckrey et al. 1961). Sowohl bei kontinuierlicher als auch bei diskontinuierlicher Applikation zeigt sich zwischen Höhe der Tagesdosis d und mittlerer Induktionszeit t bis zum Auftreten von Tumoren eine Beziehung, die der Formel $d \cdot t^n = \text{const.}$ entspricht. Der Zeitfaktor n , eine für das jeweilige Carcinogen charakteristische Zahl, nimmt meist Werte zwischen 2 und 3 an (Druckrey et al. 1964). Für DÄNA wurde ein n von 2.3 bestimmt (Rajewsky et al. 1966).

Bei sehr hoher, bereits stark toxischer Dosierung induziert DÄNA Nierentumoren. Craddock (1969) versuchte dies mit einem Enzym zu erklären, welches in der Niere eine geringere Aktivität als in der Leber aufweist und daher erst bei höheren Konzentrationen des Carcinogens dieses in die aktive Form umsetzen kann. Nach Craddock soll dieses Enzym eine N-Demethylase sein.

Bei entsprechend hoher Dosierung kann man auch durch einmalige Verabreichung eines Carcinogens Tumoren erzeugen: Nach Injektion von 70 bzw. 100 mg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff/kg - diese Substanz ist sehr kurzlebig und wird schnell zu Diazomethan hydrolysiert - entwickeln sich bei einer mittleren Latenzzeit von 320 Tagen in mehreren Organen, vor allem in Niere, Vormagen und Darm bösartige Geschwülste (Druckrey et al. 1964). Ähnliches gilt auch für Nitrosamine. Demnach könnte sich ein Prozeß, durch ein Carcinogen erst einmal genügend angestoßen, nach eigenen Gesetzen weiterentwickeln und verstärken. Eine solche "Verstärkerwirkung" wurde von Druckrey et al. (1964) postuliert. In obiger Gleichung könnte der Zeitfaktor n Ausdruck einer solchen Verstärkerwirkung sein.

Bei den hier vorgelegten Versuchen wurde aus mehreren Gründen eine Dosierung von 5 mg DÄNA/kg/Tag gewählt: Man erhält so eine fast hundertprozentige Tumor-Ausbeute (Grundmann und Sieburg 1962). Diese Tagesdosis entspricht zwei Prozent der akuten LD_{50} (Rajewsky 1967). Die toxische Wirkung scheint dabei gegen-

über der carcinogenen Wirkung ganz in den Hintergrund zu treten. Schließlich wurden mit dieser Dosierung bereits eine Reihe von Untersuchungen histologischer, autoradiographischer und cytophotometrischer Art durchgeführt, so daß man hier von einem Standardmodell der experimentellen Carcinogenese sprechen kann.

3. Morphologie der Leber

Die während der DÄNA-induzierten Carcinogenese auftretenden lichtmikroskopischen (Grundmann und Sieburg 1962) und elektronenmikroskopischen (Mölbart et al. 1962) Veränderungen sowie die während der N-Nitrosomorpholin-induzierten Carcinogenese elektronenmikroskopisch gefundenen Veränderungen (Theodossiou et al. 1971) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

In einem Initialstadium stehen Toxizitätszeichen und Zeichen kompensatorischer Zelleistungen ganz im Vordergrund. Neben Pyknosen, Cytolysen und Councilman-Körperchen findet man Hinweise für eine gesteigerte Protein- und RNS-Synthese, ferner ein funktionelles Kernödem, gehäufte Endomitosen und eine gesteigerte Mitoserate. Neben einem Ersatz geordneter Ergastoplasmamembranen durch ungeordnete, freie Bläschen des endoplasmatischen Retikulums und einer Verminderung der Ribosomen imponieren eine Proliferation des endoplasmatischen Retikulums mit Bildung von agranulärem und atypisch granuliertem Retikulum sowie eine Ribosomenvermehrung mit Bildung helixartiger Polysomen.

In der Folge kommt es zu einer zentrolobulär betonten grobbilassigen hydropischen Schwellung der Hepatocyten mit Einlagerung von Fett- und Eiweißtröpfchen und eosinophilen Schollen in das Cytoplasma. Die damit einhergehende Zunahme von Basophilie und Kleinkernen in der Läppchenperipherie darf im Sinne einer kompensatorischen Regeneration gedeutet werden.

Mit dem Übergang von der grobblasigen in eine feinblasige hydropische Schwellung scheint die "Wasservergiftung" (Grundmann und Sieburg 1962) kompensiert zu werden. In diesem Stadium sollen neben ribosomenarmen Glykogenmangelzellen ribosomenreiche Glykogenmangelzellen mit lamellärer Anordnung des endoplasmatischen Retikulums und cytoplasmatischer Hyperbasophilie entstehen. Das Schicksal dieser Zellen wird weiter unten besprochen.

Im weiteren Verlauf treten bereits makroskopisch sichtbare, hyperplastische Knötchen auf. Diese wurden von Epstein et al. (1967) bei der 2-Fluorenylacetyl- und der Äthionin-induzierten Hepatocarcinogenese genauer untersucht: In diesen Knötchen ist die Läppchenstruktur aufgehoben, eine Vermehrung des Bindegewebes geht mit einer Abnahme bzw. einem völligen Verlust der Gallengänge einher. Die großen Hepatocyten dieser "nodular portion" zeichnen sich durch reichliches Cytoplasma und unregelmäßig strukturierte cytoplasmatische Vakuolen aus. Im Gegensatz hierzu weisen die Hepatocyten der "non-nodular portion" nur geringe Unterschiede gegenüber Hepatocyten einer normalen Leber auf.

Diese Knötchen haben zwar einen ebenso hohen Glykogengehalt wie das restliche Parenchym, der physiologischerweise zu erwartende Glykogenschwund nach 24- bis 48-stündigem Hunger oder nach Glucagon bleibt dort jedoch aus. Glucose-6-Phosphatase und Glykogenphosphorylase sind in diesen Knötchen deutlich verringert. Ferner kommt es dort zu einer Abnahme des Protein-, RNS- und DNS-Gehaltes, der aber vielleicht nur durch eine Zunahme des Bindegewebes bedingt ist.

Nach Absetzen des Carcinogens persistieren die Knötchen noch für eine lange Zeit. Die obigen Autoren liefern einige Argumente für die Annahme, daß es sich bei den hyperplastischen Knötchen um die Vorläufer des Carcinoms handelt:

1. Es induzieren offenbar alle Hepatocarcinogene diese Knötchen.
2. Einige leberwirksame Verbindungen ohne carcinogene Wirkung, wie zum Beispiel das alpha-Naphthylisothiocyanat, sind unfähig, die Bildung hyperplastischer Knötchen

zu induzieren, obwohl sie die meisten von den Carcinogenen her bekannten histologischen und cytologischen Veränderungen hervorrufen können. 3. Cytologische und histologische Veränderungen, wie sie in hepatocellulären Carcinomen auftreten, findet man zwar in den hyperplastischen Knötchen, nicht jedoch im umliegenden Parenchym.

Aus den bereits erwähnten ribosomenreichen Glykogenmangelzellen sollen größere Zellverbände entstehen, die im Lichtmikroskop als hyperbasophile Bezirke imponieren. Diese wurden erstmalig von Opie (1946) im Buttergelbcarcinom beschrieben. Die hyperbasophilen Bezirke zeigen eine gesteigerte Mitoseaktivität und eine Zunahme der Kernzahl je Flächeneinheit auf Grund einer Verkleinerung des cytoplasmatischen Raumes (Daoust und Cantero 1959, Daoust 1963, Molnar und Daoust 1965). Der Mitoseanstieg geht im allgemeinen dem Anstieg der Kerndichte des Gewebes zeitlich voraus, in einigen Bezirken findet man jedoch nur einen Anstieg der Kerndichte. Dies mag darauf hinweisen, daß neben dem Mitoseanstieg auch noch andere Faktoren eine ursächliche Rolle für die Veränderungen in den hyperbasophilen Bezirken spielen (Molnar und Daoust 1965).

In der ruhenden Leber zeigen die hyperbasophilen Bezirke eine erhöhte Thymidin-Inkorporation (Mac Donald 1961) und einen Verlust der histochemischen DNase- und RNase-Aktivität (Molnar und Daoust 1965). Der Aminosäurenstoffwechsel scheint weniger verändert zu sein: Die Anfärbbarkeit cytoplasmatischer Proteine mit Mercury-bromphenol-blau bzw. der Millon-Reaktion ist in diesen Bezirken zwar verringert, nach vorheriger Hydrolyse der Nukleinsäuren mit Nukleasen unterscheidet sich jedoch die Anfärbbarkeit der hyperbasophilen Bezirke nicht mehr von derjenigen der Umgebung. Dieser Befund spricht eher für eine Maskierung - vielleicht durch eine ungewöhnliche RNS - als für einen echten Abfall der Protein-Konzentration (Brière und Daoust 1970). Nach ^3H -Leucin-Behandlung sind nukleäre und cytoplasmatische Silberkorn-dichte bei Anwendung autoradiographischer Methoden in hypo-, normo- und hyperbasophilen- sowie in Hepatom-Bezirken gleich hoch (Brière und Daoust 1970).

In diesen hyperbasophilen Bezirken sollen durch Ploidiereduktion ("Amitotischer Umschlag" nach Grundmann und Sieburg, 1962) Zellen mit diploiden Kernen und großen Nucleoli entstehen. Diese Zellen sollen die unmittelbaren Vorläufer der malignen Zellen sein. Einem steilen Anstieg der Mitoserate folgt dann schließlich die maligne Transformation.

Nach dem Gesagten zeichnet sich die Latenzperiode in erster Linie durch cytologische, viel weniger durch histologische Veränderungen aus. Von Interesse bleibt der fragliche kausale Zusammenhang zwischen hyperplastischen Knötchen, hyperbasophilen Bezirken und maligner Transformation.

Die mesenchymale Reaktion kann bei einer Dosierung von 5 mg DÄNA/kg/Tag oder einer solchen von 0,75 mg DÄNA/Tag im Versuch mit Ratten (Anfangsgewicht 150 g) vernachlässigt werden. Die mesenchymale ^3H -Thymidin-Inkorporation ändert sich erst zu ganz späten Zeitpunkten der Carcinogenese (Grundmann und Sieburg 1962, Côté et al. 1962, Rajewsky 1967, Friedrich-Frekxa et al. 1969 b). In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde höchstens eine Verbreiterung der Glisson'schen Felder - dies insbesondere nach mehrmaliger Teilhepatektomie - nie jedoch eine Cirrhose gefunden. Bei den autoradiographischen Auswertungen wurden die mesenchymalen Zellen nicht berücksichtigt.

4. Proteinstoffwechsel

Bereits drei Stunden nach einmaliger Gabe einer hohen DMNA-Dosis kommt es zu einer Abnahme der Inkorporation von ^{14}C -Aminosäuren in die Leberproteine (Magee 1958). Ein inhibitorischer Effekt des DMNA auf die Proteinsynthese wurde auch an Kernen und Mitochondrien im zellfreien System nachgewiesen (Brouwers und Emmelot 1960). Diese Befunde dürfen wahrscheinlich auch auf DÄNA übertragen werden. Sie scheinen

Folge einer unspezifisch toxischen Wirkung zu sein. Im Initialstadium der DÄNA-induzierten Carcinogenese nimmt auch die ^3H -Leucin-Inkorporation in die Leber ab. Wie bereits erwähnt, erreicht die ^3H -Leucin-Inkorporation später wieder die Werte unbehandelter Kontrolltiere (Brière und Daoust 1970). Ein gesteigerter nukleärer und cytoplasmatischer Eiweiß-Umsatz läßt sich in späteren Stadien der Buttergelb-Carcinogenese in den Hepatocyten nachweisen. Trotz vermehrter nukleärer RNS-Synthese verarmt dabei das Cytoplasma an Nukleoproteiden (Hempel et al. 1962). Diese Veränderungen werden auch bei der DÄNA-Carcinogenese diskutiert.

5. Nukleinsäurestoffwechsel

Nach 26-tägiger kontinuierlicher Gabe von 4 mg DÄNA/kg/Tag ist der Einbau von ^{14}C -Orotsäure in die RNS deutlich herabgesetzt (Kröger und Kessel 1968). In späteren Stadien der DÄNA-Carcinogenese nimmt der Einbau von ^3H -Cytidin in die Hepatocyten immer mehr zu (Schauer 1966, Schauer und Kunze 1968). Dieser gesteigerte Cytidin-Einbau spricht - sieht man von Verschiebungen im Nukleotidpool ab - für eine gesteigerte RNS-Synthese. Die quantitativen Veränderungen der DNS-Synthese während der DÄNA-Carcinogenese sollen im Versuchsteil I genauer besprochen werden.

Eine Reihe von Untersuchungen spricht dafür, daß die Dialkylnitrosamine die Nukleinsäuren auch in qualitativer Weise verändern: Bereits fünf Stunden nach Injektion von 30 mg ^{14}C -DMNA/kg zeigt sich eine hohe spezifische Radioaktivität in der RNS der Leber. Diese nimmt fünfmal höhere Werte an als die Radioaktivität der Aminosäuren, gemessen am Gehalt an ^{14}C -Methionin, ^{14}C -Leucin und ^{14}C -Valin. Nach Hydrolyse der markierten RNS findet man einen Radioaktivitätsgipfel beim 7-Methylguanin (Magee und Farber 1962). Bei analogen Untersuchungen mit ^{14}C -DÄNA erhält man zwar radioaktives 7-Äthylguanin, doch wird auch bei Verabreichung der halben

akuten LD₅₀ von ¹⁴C-DÄNA nur relativ wenig Guanin äthylisiert (Craddock und Magee 1965). Die Äthylisierung von Guanin nach DÄNA-Gabe ist zehnmal geringer als die Methylierung nach DMNA-Gabe (Swann und Magee 1969).

Die Dialkylnitrosamine alkylieren neben Guanin auch andere Basen. Bei einer Gesamtanalyse beider Nukleinsäuren nach Injektion von ¹⁴C-DMNA erhielten Lawley et al. (1968) folgende Verteilung der Methylierungsprodukte: 85-90% Methylguanin, 3-6% 1- und 3-Methyladenin und 2-3% 1-Methylcytosin. Einige dieser Methylierungsprodukte findet man aber bereits in den Nukleinsäuren unbehandelter Ratten. Die Methylierung durch DMNA scheint dennoch relativ unspezifisch zu sein. Bei der Äthylisierung durch L-Äthionin-äthyl-T-¹⁴C entsteht vergleichsweise nur ein peak. Dieser entspricht einem Äthyl-Analogen des Methylguanido-arginins (Friedman et al. 1969).

Das Verhältnis von alkylierter Leber-DNS zu alkylierter Leber-RNS ist bei unterschiedlicher Carcinogen-Dosierung etwa konstant. Daraus darf geschlossen werden, daß auch bei niedriger Dosierung das alkylierende Intermediärprodukt relativ leicht in den Kern gelangt (Craddock 1969). Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, daß alle Nukleinsäuren in gleichem Maße alkyliert werden. Die t-RNS zum Beispiel wird nach Gabe von Äthionin etwa 20 mal stärker äthyliert als nukleäre RNS oder m-RNS (Farber et al. 1967).

Ungefähre Vorstellungen über den zeitlichen Ablauf der Nukleinsäuren-Alkylierung nach einmaliger Verabreichung eines Dialkylnitrosamins geben Untersuchungen von Craddock und Magee (1965): Das Maximum der DNS-Methylierung zeigt sich in der Leber und der Niere bereits fünf Stunden nach einer ¹⁴C-DMNA-Injektion. Zu späteren Zeitpunkten kommt es zu einem steilen Abfall, und zwölf Stunden nach der Injektion findet man nur noch einen sehr niedrigen Wert für die DNS-Methylierung. Die maximale RNS-Methylierung hingegen

erstreckt sich zwischen der fünften und zwölften Stunde nach der Injektion, daran schließt sich ein langsamer Abfall an. Noch drei Wochen nach der Injektion ist eine kleine Menge methylierter RNS nachweisbar. Die maximale Nukleinsäuren-Methylierung nimmt in der Leber etwa zehnmal höhere Werte an als in der Niere. Der Abfall methylierter Nukleinsäuren verläuft in der Niere jedoch wesentlich flacher als in der Leber.

Unklar bleibt, welche Bedeutung diesen Befunden zukommt. Die extensive Alkylierung von Guanin zu 7-Alkyl-Guanin könnte die Ursache für die mutagene und die carcinogene Wirkung der Dialkylnitrosamine sein. Man weiß, daß sich in Tumorzellen die Basensequenz der Nukleinsäuren ändern kann. Während normalerweise in der nukleolären 45s-RNS die Basenanteile von AMP und CMP 20% bzw. 24% betragen (Busch et al. 1968), findet man in der 45s-RNS aus Morris-Hepatomen sowie in der 45s-RNS aus anderen Tumoren für AMP und CMP Werte von 12-15% bzw. 29-33% (Wikman et al. 1970). Novikoff-Hepatome und Morris 9618 A-Hepatome zeichnen sich gegenüber der normalen Leber durch einen erhöhten Gehalt an GC- und GU-Dinukleotiden aus (Yazdi et al. 1969). Nach Gabe von N-Nitrosomorpholin treten Verschiebungen im Basenverhältnis aller untersuchten RNS-Fractionen auf. Dabei kommt es hauptsächlich zu einer Zunahme des Guanin-Anteils (Meyer-Bertenrath und Dege 1967). Nach anderen Untersuchungen hingegen unterscheiden sich die normale und die praecancerotische Leber nur unwesentlich in ihrem RNS-Basenverhältnis. Die zu verschiedenen Zeitpunkten während der N-Nitrosomorpholin-induzierten Carcinogenese aus der Leber isolierte DNS erwies sich in ihrer Matritzenfunktion im RNS-Polymerase-System als unverändert (Kröger und Lücking 1967).

Darüber hinaus ist in der praeneoplastischen Leber der Nukleasen-Gehalt verändert. Während der Carcinogenese durch Azo-Verbindungen kommt es zu einem progressiven Verlust der aktiven RNasen und zu einem abrupten Verlust der aktiven

DNasen, letzteres kurz vor Einbruch der malignen Transformation (Amano und Daoust 1961). Mit der histochemischen Substrat-Film-Methode wurde in einer ganzen Reihe experimenteller und humaner Tumoren (hepatocelluläres Carcinom, Novikoff Hepatom, Walker Sarkom 256, Murphy-Sturm-Lymphosarkom, solider Ehrlich Tumor u. a.) ein völliger Aktivitätsverlust beider Nukleasen nachgewiesen (Daoust und Amano 1963). Auch mit biochemischen Methoden wurde in malignen Tumoren ein Aktivitätsverlust der Nukleasen gefunden (Ambellan und Hollander 1966, Arora und de Lamirande 1968, Chakravorty und Busch 1967). Taper et al. (1971) beschreiben einen progredienten histochemischen Aktivitätsverlust der sauren und alkalischen Nukleasen in den hyperplastischen Knötchen während der N-Nitrosomorpholin-induzierten Carcinogenese (8 mg/kg/Tag). Dieser Prozeß korreliert zeitlich mit dem Übergang der zuerst trabekulär strukturierten Knötchen in die adenomatös proliferierenden Knötchen und der in diesen Knötchen einsetzenden malignen Transformation. In den peripheren Zonen nekrotischer Herde jedoch taucht dann plötzlich wieder eine histochemische Aktivität dieser Enzyme auf. Dies mag als Hinweis dafür gelten, daß die Nukleasen den hyperplastischen Knötchen nicht verloren gehen, sondern nur inaktiviert und in den nekrotischen Herden dann reaktiviert werden. Demnach müßte man für praeneoplastisches Gewebe Nukleasen-Inhibitoren fordern. Ein Anstieg solcher Inhibitoren wurde bei Lymphosarkomen, Leukämien und anderen Tumoren beschrieben (Ambellan und Hollander 1966, Chakravorty und Busch 1967, Nagao und Ichikawa 1969). Auf die mögliche Bedeutung des Nukleasen-Verlustes für die Carcinogenese soll später noch eingegangen werden.

6. Glykogen

Der Glykogengehalt der Leber ändert sich während der DÄNA-induzierten Carcinogenese in charakteristischer Weise. Im

Stadium der grobblasigen Schwellung verarmen zentrale und intermediäre Läppchenabschnitte an Glykogen (Grundmann und Sieburg 1962, Bannasch 1967). Zu späteren Zeitpunkten treten "Inseln" mit einem Schwund der histochemischen Glucose-6-phosphatase-Aktivität auf. In diesen Inseln ist die Hunger- und Glucagon-induzierte Glykolyse gestört (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b). Ähnliches gilt für die durch 2-Fluorenylacetamid oder Äthionin hervorgerufenen hyperplastischen Knötchen (Siehe S. 5).

Darauf folgt ein Stadium erhöhten Glykogengehaltes. Hierbei zeigen sich starke Geschlechtsunterschiede. Bei kontinuierlicher Gabe von 1 mg DÄNA/kg/Tag weist die Leber männlicher Tiere am 75. Fütterungstag keinen erhöhten Glykogengehalt, die weiblicher Tiere dagegen einen 8-fach erhöhten Glykogengehalt auf. Am 120. Fütterungstag ist der Glykogengehalt bei männlichen Tieren um 50 % gestiegen und bei weiblichen Tieren wieder beträchtlich gesunken. In ausgeprägten Hepatomen ist bei beiden Geschlechtern der Glykogengehalt auf das 6-fache erhöht (Sydow und Fey 1969). Von diesen Autoren wurden die Geschlechtsunterschiede als Argumente gegen eine kausale Bedeutung des Glykogenstoffwechsels für die Carcinogenese angeführt.

Dem Stadium erhöhten Glykogengehaltes folgt mit dem Auftreten cytologischer Malignitätszeichen in den Mikrocarcinomen ein starker Glykogenschwund. Die Mikrocarcinome sind auch zu keiner Resynthese des Glykogens mehr fähig (Grundmann und Sieburg 1962, Bannasch 1967, Friedrich-Frekxa 1969 b). In den 2-Fluorenylacetamid- und Äthionin-induzierten hepatocellulären Carcinomen ist der Glykogengehalt gegenüber dem der normalen Leber auf 1 % erniedrigt (Epstein et al. 1967). Dazu paßt auch, daß stark glykogenhaltige, transplantable Hepatome, die anfangs nur sehr langsam wachsen, im Laufe mehrerer Passagen ihr Glykogen verlieren und zugleich ihre Wachstumsgeschwindigkeit erhöhen (Reuber und Firminger 1963, Reuber 1966).

7a. Cytoplasmatische Angriffspunkte

Von vielen Autoren wird der erste carcinogene Schritt in einer Proteindenaturation im Sinne von Rondoni (1955) gesehen. Eine solche Protein-Deletions-Hypothese wird u. a. von Miller und Miller (1953), Rusch (1954), Potter (1957) und Heidelberger (1959) vertreten. Eine mehr oder weniger signifikante Beziehung zwischen carcinogener Potenz und Bindungsfähigkeit an lösliche Plasmaproteine ist für Aminoazoverbindungen (Sorof et al. 1951), für 2-Acetylaminofluoren-Derivate (Sorof et al. 1960) und für einige Kohlenwasserstoffe (Abell und Heidelberger 1962) nachgewiesen. Während der experimentellen Cancerisierung der Mäuseepidermis mit Methylcholanthren (Oehlert et al. 1961, Oehlert und Côté 1962) und während der Cancerisierung der Leber mit Buttergelb (Hempel et al. 1962) verarmt das Cytoplasma trotz gesteigerter nukleärer RNS-Synthese an Nukleoproteiden (Siehe auch S. 8). Quantitativ-biochemische Bestimmungen während der 4-Dimethylaminoazobenzol-induzierten Hepatocarcinogenese (Hadjiolov und Tentschewa 1958) und cytophotometrische Bestimmungen während der DÄNA-induzierten Carcinogenese (Hobik und Grundmann 1962) zeigen, daß mit der Verarmung des Cytoplasmas an Nukleoproteiden ein Abbau der Strukturproteine des Ergastoplasmas einhergeht.

Aus diesen Beobachtungen leitete die Gruppe von Büchner (1961) folgende Hypothese ab: Einem beschleunigten Verbrauch cytoplasmatischer Nukleoproteine folgt ein Abbau der entsprechenden cytoplasmatischen Strukturen, insbesondere des Ergastoplasmas. Damit wird das Cytoplasma entdifferenziert und seine physiologische Hemmwirkung auf die nukleäre DNS-Synthese beseitigt. Die hieraus resultierende vermehrte nukleäre RNS-Synthese versucht den Mangel an cytoplasmatischen Nukleoproteiden zu kompensieren. Das neugebildete, "unspezifische" Eiweiß ist jedoch nicht mehr in der Lage, die physiologische Steuerung der DNS-Synthese zu übernehmen. Der Kern antwortet mit einer ungehemmten DNS-Synthese.

Morphologisches Korrelat dieser Hypothese wären die Disorganisation des endoplasmatischen Retikulums mit Ribosomenverminderung sowie die Größenzunahme von Kernen und Nukleolen (Siehe auch S. 4).

Eine Permeabilitätsveränderung der Kernmembran mit daraus resultierender Ausschleusungsstörung für nukleäre RNS aus dem Kern in das Cytoplasma scheint nicht vorzuliegen: Schauer und Kunze (1968) konnten mit autoradiographischen Untersuchungen während der DÄNA-Carcinogenese nach kurzzeitiger Cytidin-Markierung zeigen, daß es hierbei zum normalen Übertritt von Radioaktivität in das Cytoplasma kommt.

Denkbar wäre auch eine unmittelbare Zerstörung der in das Cytoplasma abgegebenen RNS durch das Carcinogen. Die Zellen könnten jedoch einen solchen Vorgang auf die Dauer nur durch hinzukommende Schutzmechanismen, wie zum Beispiel eine detoxifizierende Enzyminduktion, tolerieren.

Gut vereinbar mit einer Protein-Deletions-Hypothese sind auch fluoreszenztechnisch gewonnene Ergebnisse, nach denen Kohlenwasserstoff-Carcinogene sowohl in vivo als auch in vitro schnell in das Cytoplasma aufgenommen werden und dort für mehrere Wochen nachweisbar sind (Richter und Saini 1960, Sloane und Loeser 1963).

Bei der Kohlenwasserstoff-Carcinogenese wird auch eine entscheidende Rolle der Lysosomen diskutiert. Man vermutet, daß die Kohlenwasserstoffe selektiv in den Lysosomen konzentriert werden und die Stabilität lysosomaler Membranen senken (Allison und Mallucci 1964). Die Lysosomen enthalten u. a. hydrolytische Enzyme, ferner saure Phosphatasen, saure DNase und saure Proteasen (de Duve 1959). Hohe Carcinogen-Konzentrationen könnten demnach zu einer beträchtlichen Freigabe lysosomaler Enzyme mit starker cytotoxischer Wirkung führen. Bei niedrigen Carcinogen-Konzentrationen könnten diese Enzyme in graduierter Weise in das Cytoplasma abgegeben werden und vielleicht den Kontrollmechanismus der Zellteilung stören. Auch diese Überlegungen dürfen nicht vorbehaltlos auf die Dialkylnitrosamin-Carcinogenese übertragen werden.

Die t-RNS ist nach Gabe von Äthionin die am stärksten äthylierte RNS in der Rattenleber (Farber et al. 1967). Daher wurde auch sie als möglicher cytoplasmatischer Angriffspunkt diskutiert. Ferner wurde an eine Bedeutung der schnell sedimentierenden r-RNS gedacht. Meyer-Bertenrath und Dege (1967) diskutieren auch einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhter Synthese von r-RNS und der gleichzeitigen Abnahme cytoplasmatischer Polysomen. Eine Beziehung zwischen carcinogener Potenz einer Substanz und deren Bindungsfähigkeit an die r-RNS ist beschrieben worden (Roberts und Warwick 1966).

Eine weitere Möglichkeit eines primär cytoplasmatischen Angriffs ist bisher kaum geprüft worden: Vielleicht werden cytoplasmatische Lipide in labile Alkylierungsprodukte umgewandelt, welche in der Lage sind, mit anderen Zellkomponenten zu reagieren.

7b. Nukleäre Angriffspunkte

Neben den mit radioaktiv markierten Carcinogenen erhaltenen Befunden (Siehe S. 8, 9 und 10) spricht die Irreversibilität vieler praeneoplastischer Veränderungen - v. a. die Irreversibilität in Absetz-Versuchen - für eine entscheidende Rolle der DNS wie überhaupt des ganzen Nukleinsäurestoffwechsels. Die für eine Reihe aromatischer Kohlenwasserstoffe gefundene Parallele zwischen carcinogener Potenz und kovalenter Bindung an die DNS (Brookes und Lawley 1964, Sporn und Dingman 1966) konnte aber für die Dialkylnitrosamine nach Bestimmung des DNS-Alkylierungsgrades nicht bestätigt werden, Von Magee (1962) sind noch andere Argumente gegen die Bedeutung der Alky-

lierung für die Carcinogenese erhoben worden: Es gibt viele biologische, alkylierende Substanzen mit relativ schwacher carcinogener Wirkung (Brookes und Lawley 1964), umgekehrt gibt es einige zyklische Nitrosamine (z. B. N-Nitrosomorpholin), bei denen eine Alkylierung erst nach Aufspaltung des Ringes möglich wäre. Arcos und Arcos (1962) halten eine solche Ringöffnung für unwahrscheinlich.

Sicherlich ist die Alkylierung der Nukleinsäuren ein auffallender Befund. Dennoch muß auch an andere, quantitativ kaum faßbare Stoffwechselprodukte gedacht werden, die vielleicht mit Zellbestandteilen reagieren und dabei sofort wieder zerstört werden. Man hat deshalb nach weiteren Intermediärprodukten, vor allem nach Aldehyden, salpetriger Säure, Hydroxylderivaten und Hydrazinderivaten gesucht. Die Aldehyde besitzen aber wahrscheinlich keine carcinogene Wirkung (Shubik und Hartwell 1957). Die salpetrige Säure hat eine starke mutagene Wirkung durch Desaminierung von Guanin und Adenin zu Xanthin und Hypoxanthin. Bei der Dialkylnitrosamin-induzierten Carcinogenese sind jedoch neben dem 7-Alkyl-Guanin keine weiteren abnormen Basen in größerem Ausmaß gefunden worden (Craddock und Magee 1966). Hydroxylamin besitzt zwar einen starken mutagenen Effekt, es hat aber ebenso wie Hydralazin keine carcinogene Wirkung.

Neben einer direkten Aktion zwischen aktivem Carcinogen und der DNS bestände auch noch die Möglichkeit einer indirekten Aktion. Diese könnte über nukleäre Histone, über Repressoren oder entsprechend der extrachromosomalen Mutationshypothese vermittelt werden. Nach dieser Hypothese wäre lediglich ein Angriff auf endogene oder exogene Repressoren und Induktoren notwendig. Ein veränderter Zustand von Regulatorgen und Operon wäre die Folge. Ohne eigentlichen Angriff auf die DNS könnte ein solcher Mechanismus auch zu reversiblen praeneoplastischen Veränderungen führen (Pitot und Heidelberger 1963).

Unklar ist auch die Bedeutung der Enzyme des Nukleinsäurestoffwechsels für die Carcinogenese. Die Aktivität der Thymidylat-Kinase zeigt in der adulten Mäuseleber und in Hepatomen gleich hohe Werte. Im ersten Fall ist dieses Enzym jedoch partikelgebunden und erscheint erst nach Auseinanderreißen der zellulären Bestandteile, während im zweiten Fall das Enzym ohne Bindung an Zellpartikel vorliegt (Kielley 1963). Godwin et al. (1967) diskutieren eine Aktivitätssteigerung der RNS-Polymerase, welche für den Anstieg der nukleolären RNS-Synthese in frühen Stadien der Dimethylaminoazobenzol-Carcinogenese verantwortlich sein soll.

Der Verlust histochemischer Nukleasen-Aktivitäten ist bereits erwähnt worden (Siehe S. 10 und 11). Daoust und Amano (1963) halten es für möglich, daß das entscheidende Ereignis der Prae-neoplasie ein langsam-progressiver Verlust der RNasen-Aktivität und das entscheidende Ereignis der malignen Transformation ein abrupter Verlust der DNasen-Aktivität ist. Von diesen Autoren, ferner von Taper et al. (1971), wird vermutet, daß die Nukleasen die genetische Stabilität der Zellen gegenüber dem Angriff transformierender Nukleinsäuren zu schützen haben. Ein Verlust der Nukleasen könnte demnach die sofortige und irreversible maligne Transformation der praeneoplastischen Zellen zur Folge haben.

II. ALLGEMEINE FRAGESTELLUNG UND SKIZZIERUNG DES VERSUCHSMODELLS.

Ein breites Spektrum standardisierter Modelle der experimentellen Carcinogenese zeigt, wie bereits vor dem Auftreten morphologischer Malignitätszeichen Veränderungen in der Wachstumsregulation und im Funktionsstoffwechsel manifest werden. Hierbei gehen unspezifische Veränderungen, die für die Carcinogenese ohne Bedeutung sind, mit Veränderungen einher, die in kausalem Zusammenhang mit der Carcinogenese gesehen werden.

In der hier vorgelegten Arbeit sollen unter kontinuierlicher Gabe eines Carcinogens Alterationen der Proliferationsaktivität und des Funktionsstoffwechsels in Hepatocyten während der Latenzperiode bis zum Auftreten von Hepatomen untersucht werden. Es wird versucht, Störungen der Proliferationsaktivität und des Funktionsstoffwechsels miteinander zu korrelieren. Ferner soll die Latenzperiode auf Grund der Veränderungen im biologischen Verhalten der Zellen in einzelne Stadien unterteilt werden.

Das in den Experimenten angewandte Modell sei mit den folgenden vier Punkten kurz skizziert:

1. Die Carcinogenese wird mit Diäthylnitrosamin in der Rattenleber induziert.
2. Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wird in der ruhenden und in der regenerierenden Leber die DNS-Synthese-Aktivität autoradiographisch untersucht.
3. Als Wachstumsreiz dienen standardisierte Teilhepatektomien.
4. Die funktionelle Leistung wird bemessen nach der histochemischen Aktivität zweier Enzyme.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. INKORPORATION VON ^3H -THYMIN IN DIE HEPATOCYTEN DER RUHENDEN UND DER REGENERIERENDEN LEBER WÄHREND DER DIÄTHYLNITROSAMIN-INDUZIERTEN CARCINOGENESE NACH PULSMARKIERUNG.

1. Proliferationsaktivität und ^3H -Thymin-Markierungsindex.

Gegenstand der folgenden Untersuchungen ist die Proliferation der Hepatocyten während der Latenzperiode bis zum Auftreten von Tumoren. Diese soll verglichen werden mit der Proliferation einer normalen Leber sowie dem autonomen Wachstum malignen Gewebes.

In der normalen Leber wird die Veränderung des numerischen Zellgehaltes je Zeiteinheit (Proliferationsaktivität) über eine organspezifische, homöostatische Wachstumsregulation gesteuert. Daraus resultieren eine *b a s a l e* Proliferationsaktivität der ruhenden Leber und eine *i n d u z i e r b a r e* Proliferationsaktivität der einem Wachstumsreiz ausgesetzten Leber.

Beim Endstadium der DÄNA-induzierten Carcinogenese, dem hepatocellulären Carcinom, wird man auf Grund der Wachstums-Autonomie einen partiellen oder vollständigen Verlust von basaler und induzierbarer Proliferationsaktivität zugunsten einer tumorspezifischen, *e n d o g e n e n* Proliferationsaktivität vermuten.

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurde hier folgendes Verfahren gewählt: Nach einmaliger Injektion (Pulsmarkierung) wird ^3H -Thymin selektiv in die zu diesem Zeitpunkt DNS-synthetisierenden Zellen (S-Phasen-Zellen)

inkorporiert. Diese Zellen können im Autoradiogramm erkannt werden. Der prozentuale Anteil der S-Phasen-Zellen an der Gesamtzellzahl wird ^3H -Thymidin-Markierungsindex ($\text{TdR-}^3\text{H-MI}$) genannt. Er kann mit Einschränkungen als indirekter Parameter für die Proliferationsaktivität herangezogen werden.

In den folgenden Untersuchungen sind bei der Wertung des $\text{TdR-}^3\text{H-MI}$ als beeinflussende Faktoren besonders zu berücksichtigen:

1. S-Phasen-Dauer/Zellcyclus-Dauer (t_s/t_c).
2. Wachstumsfraktion (GF) (Mendelsohn 1962a, 1962b).
3. Zelluläres Auflaufen in der G_2 -Phase (Simard et al. 1968).
4. ^3H -Thymidin-Nebenwirkungen (Teilsynchronisation, Mitosehemmung) (Grisham 1960).

Mit diesem Verfahren soll nicht nur die relative Häufigkeit der S-Phasen-Zellen sondern auch deren Topik und deren zeitliches Auftreten bei veränderter Proliferation untersucht werden.

2. Literaturübersicht.

In der ruhenden Leber ausgewachsener Ratten (physiologisches Ersatzwachstum) durchlaufen zu jedem Zeitpunkt 0.1-0.29% aller Hepatocyten die S-Phase (Grisham 1962, Côté et al. 1962, Oehlert 1962, Stöcker et al. 1964, Rajewsky 1967). Kontinuierliche Gabe von DÄNA beeinflusst die DNS-Synthese der Hepatocyten. Côté et al. (1962) bestimmten bei adulten Ratten (Anfangsgewicht 150 g) nach einer Dauerapplikation von 0.75 mg DÄNA/Tag den $\text{TdR-}^3\text{H-MI}$ der Hepatocyten nach Pulsmarkierung. Sie fanden für den 0., 15., 45., 65., 95., 103., 120. und 130. Fütterungstag Werte von 0.2, 0.8, 0.99, 2.1, 0.62, 1.0, 2.82 und 4.03%. In den später erscheinenden Mikrocarcinomen und Carcinomen stieg der $\text{TdR-}^3\text{H-MI}$ auf 14.2 bzw. 15.1%. Rajewsky (1967) beschreibt bei adulten Ratten nach Dauertränkung mit 5 mg DÄNA/kg/Tag bereits innerhalb der ersten zwanzig

Versuchstage eine Zunahme des TdR- ^3H -MI der Hepatocyten von ursprünglich 0,29 % auf das 2,5- bis 3,0-fache. Die am 120. Fütterungstag auftretenden basophilen Bezirke zeichneten sich zum Teil durch einen TdR- ^3H -MI bis zu 15 % aus. In vitro-Untersuchungen (Rajewsky 1967) ergaben nach DÄNA-Dauerapplikation einen initialen, etwa drei bis fünf Tage anhaltenden Abfall und einen daran anschließenden kontinuierlichen Anstieg des TdR- ^3H -MI in der Rattenleber. In Analogie zu diesen in vitro-Untersuchungen beschreibt Friedrich-Frekxa (1970) eine initiale Depression des TdR- ^3H -MI der Hepatocyten nach DÄNA-Gabe in vivo.

Ebenso deuten Befunde über die Dauer des Zellcyclus auf eine veränderte Proliferationsaktivität der Hepatocyten während der DÄNA-induzierten Carcinogenese hin: Leevy (1967) nimmt für Hepatocyten adulter Ratten ein t_c von 150-200 Tagen an. Für Hepatomzellen hingegen wurde ein t_c von 21,5 Stunden (Post und Hoffman 1964) bzw. 14 Stunden (Rabes 1969) gefunden. Das "Prozent markierte Mitose-Verfahren" nach Quastler und Sherman (1959) ergibt für die Cyclusdauer und für die S-Phasen-Dauer bei Hepatomzellen ähnliche Werte wie bei Leberzellen in Kultur, bei denen offenbar auch die Proliferation gegenüber funktionellen, differenzierteren Leistungen ganz im Vordergrund steht (Rabes und Jantsch 1971). Gut vereinbar mit dieser Überlegung ist auch ein t_c von 21,5 Stunden, welches von Post et al. (1963) für das exponentielle Wachstum der Hepatocyten juveniler Ratten angegeben wird.

Während der DÄNA-Carcinogenese scheint sich auch die Topik der DNS-synthetisierenden Zellen in charakteristischer Weise zu ändern: In der unbehandelten, adulten Rattenleber liegen die wenigen S-Phasen-Zellen diffus über das Leberläppchen verstreut (Oehlert et al. 1962, Fabrikant 1968). Côté et al. (1962) fanden hingegen nach Dauertränkung mit 0,75 mg DÄNA/Tag bei adulten Ratten am 15. Versuchstag ein Überwiegen der DNS-synthetisierenden Hepatocyten in der Läppchenperipherie, am 45. Versuchstag deren Überwiegen in den intermediären Läppchenabschnitten und zu späteren Zeitpunkten eine immer stärkere Zunahme dieser Zellen im Läppchenzentrum.

Die bisher zitierten Befunde deuten auf eine Veränderung von basaler und endogener Proliferationsaktivität während der Carcinogenese hin. Weit weniger untersucht wurde bisher das Verhalten der induzierbaren Proliferationsaktivität während der DÄNA-Carcinogenese. Bei unbehandelten adulten Ratten folgt einer 2/3-Hepatektomie nach einer Latenzzeit von 15-18 Stunden eine schnelle Zunahme DNS-synthetisierender Hepatocyten. Das Maximum dieser Zellen findet man 20-24 Stunden nach der Operation. Während der folgenden 2-3 Wochen erreicht die Zahl der S-Phasen-Zellen langsam wieder ihren ursprünglichen Wert (Grisham 1962, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczec 1970). Der größte Teil des Zelldefizits wird in den ersten drei postoperativen Tagen ersetzt (Fabrikant 1968). Diese Regeneration zeigt auch eine charakteristische Topik der S-Phasen-Zellen. Zu Beginn sind die S-Phasen-Zellen auf lobuloperiphere Bezirke beschränkt. Während des Synthesemaximums liegen etwa 75% dieser Zellen im peripheren Lappchendrittel, 20% im intermediären und nur 5% im zentralen Drittel. In der Folge verlagert sich die DNS-Synthese immer mehr in das Lappchenzentrum. 40 Stunden nach der Operation liegen die meisten S-Phasen-Zellen im zentralen Lappchenfünftel. 48 Stunden nach der Operation beginnt möglicherweise eine zweite Synthesewelle in der Lappchenperipherie (Grisham 1962, Fabrikant 1968, Rabes und Tuczec 1970). Quantitative Beschreibungen über den Verlauf dieser DNS-Synthesewelle während der DÄNA-Carcinogenese liegen bisher nicht vor.

3. Material und Methode.

3.1. Der TdR-³H-MI in der ruhenden Leber.

26 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 100-120 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag.

Je drei Tieren wurde am 10., 40., 70., 90., 110., 120.,

130. und 140. Versuchstag zwischen 8⁰⁰ und 9⁰⁰ Uhr 0.8 μ C/g Thymidin-6-³H (Spezifische Aktivität 5 C/mM, Radiochemical Centre Amersham) in Hanks-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 60 Minuten radioaktiver Versuchszeit wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet.

Die sofort entnommenen Lebern wurden in Formol (10%) unter Zusatz von 0.1 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 5 μ m dicken Schnitten und wiederholter Waschung in nicht tritiiertem Thymidin wurden mit einem Stripping-Film (Kodak AR 10) Autoradiogramme mit einer Expositionszeit von 27 Tagen hergestellt. Die Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Eine Kontrollgruppe von 3 männlichen Ratten desselben Stammes mit einem Anfangsgewicht von 110 g wurde ohne DÄNA-Gabe in gleicher Weise behandelt.

3.2a. Der TdR-³H-MI in der regenerierenden Leber.
35 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 140-150 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag.

Am 10., 30., 50., 70., 90., 110., 120., 130. und 140. Versuchstag wurden 5, 5, 3, 5, 3, 4, 4, 3 bzw. 3 Tiere in Äthernarkose nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) 2/3-hepatektomiert. Alle Operationen erfolgten zwischen 8⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr.

Eine Kontrollgruppe von 5 männlichen Ratten desselben Stammes mit einem Anfangsgewicht von 150 g wurde ohne DÄNA-Gabe in gleicher Weise behandelt.

Nach der Operation erhielten die Tiere nur noch Altromin-Standarddiät und Trinkwasser, jedoch kein DÄNA mehr.

24 Stunden nach der Operation wurde den Tieren Thymidin-6-³H (siehe oben) intraperitoneal injiziert. Nach 60 Minuten radioaktiver Versuchszeit erfolgte Tötung, Leberent-

nahme, Fixierung und Einbettung nach obigem Schema. Von den Schnitten wurden mit der Emulsion K 2, Ilford, Autoradiogramme mit einer Expositionszeit von 28 Tagen hergestellt. Die Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

3.2b. Topik der markierten Hepatocyten in der regenerierenden Leber.

Auch hierbei wurden die Autoradiogramme des Abschnittes 3.2a ausgewertet.

3.2c. DNS-Synthesewelle in der regenerierenden Leber am 72. Fütterungstag.

10 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 140-150 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag.

Je 2 Tiere wurden am 70. Versuchstag um 21 Uhr und am 71. Versuchstag um 0, 3, 6 und 9 Uhr nach der Methode von Higgins und Anderson 2/3-hepatektomiert. Vor den Operationen wurde das DÄNA abgesetzt. Am 72. Versuchstag erhielten alle Tiere um 9 Uhr Thymidin-6-³H in obiger Weise. Das Intervall zwischen Teilhepatektomie und Injektion von radioaktivem Thymidin dauerte demnach 24, 27, 30, 33 und 36 Stunden. Die Tiere wurden nach 60 Minuten radioaktiver Versuchszeit getötet. Die weitere Behandlung entsprach dem Schema in Abschnitt 3.2a.

Mikroskopische Auswertung.

Zu 3.1: Bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100-fach, Großfeldokular 10-fach) wurde durch meanderförmige Einzellauszahlung für jeweils 1000 Hepatocyten der TdR-³H-MI bestimmt. Für jedes Tier wurden in 3 voneinander unabhängigen Präparaten insgesamt 9000 Hepatocyten ausgezählt.

Zu 3.2a: Bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100-fach, Großfeldokular 10-fach) wurde durch meanderförmige Einzelzellauszählung für jeweils 1000 Hepatocyten der TdR-³H-MI bestimmt. Für jedes Tier wurden in 5 bzw. 6 voneinander unabhängigen Präparaten insgesamt 5000 bzw. 6000 Hepatocyten ausgezählt.

Zu 3.2b und 3.2c: Der TdR-³H-MI wurde hier als Funktion des Standortes der Hepatocyten innerhalb des Leberläppchens (Topik) bestimmt. Bei 60-facher Vergrößerung (Objektiv 6-fach, Großfeldokular 10-fach) wurden Lobuli aufgesucht, deren Zentralvene und Portalregion zugleich angeschnitten waren. Ein die Zentralvene mit dem Glisson'schen Dreieck verbindender Parenchymstreifen wurde mit einem Okularzählraster in gleich große Felder (3x1 Rastereinheiten) unterteilt. Das erste Feld grenzte an die Zentralvene, das letzte - dies war entsprechend der Entfernung von Zentralvene zu Glisson'schem Dreieck das 15. bis 22. Feld - grenzte an das Glisson'sche Dreieck. In jedem Feld lagen etwa 8 bis 15 Hepatocyten. Durch Einzelzellauszählung wurde für jedes Feld der TdR-³H-MI bei 450-facher Vergrößerung (Objektiv 45-fach, Großfeldokular 10-fach) bestimmt. Für jedes Tier wurden an 3 Autoradiogrammen insgesamt 15 solche Parenchymstreifen ausgezählt. Bei der Auswertung wurden die Parenchymstreifen unterschiedlicher Länge auf ein 10-fach unterteiltes "Idealbälkchen" projiziert und schließlich die 15 bis 22 Felder eines Parenchymstreifens den 10 Feldern des Idealbälkchens zugeordnet. Hiermit konnten für jedes untersuchte Leberläppchen 10 TdR-³H-MI-Werte angegeben werden.

4. Statistik.

Die Berechnung des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Stichprobe $x_1, \dots, x_n$ erfolgte nach der Gleichung:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} .$$

Die Standardabweichung s wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2} .$$

Für die Berechnung des mittleren Fehlers des Mittelwertes $s\bar{x}$ wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$s\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}} .$$

Die Mittelwertsdifferenzen zweier Stichproben (A und B) wurden mit dem Student-t-Test auf ihre Signifikanz geprüft. Dabei erfolgte die Berechnung der Signifikanzschwelle nach folgender Formel:

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{k} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}} .$$

Hierbei ist k nach folgender Formel zu berechnen:

$$k = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_{Aj} - \bar{x}_A)^2 + \sum_{j=1}^n (x_{Bj} - \bar{x}_B)^2}{n_A + n_B - 2}} .$$

Eine Signifikanz wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner war als 0.05. (Dabei ergab sich p tabellarisch (Geigy-Wissenschaftliche Tabellen 1968) in Abhängigkeit von t und $(n_A + n_B - 2)$ Freiheitsgraden.

Die symmetrische Verteilung der Stichprobenwerte einer Reihe wurde durch graphische Darstellung der Stichprobenwerte überschlägig geprüft. Bei asymmetrischer Verteilung wurde lediglich $\bar{x}$ bestimmt.

5. Ergebnisse.

5.1. Der TdR-³H-MI in der ruhenden Leber.

In der ruhenden Leber steigt der TdR-³H-MI der Hepatocyten nach Pulsmarkierung vom Versuchsbeginn bis zum 130. Fütterungstag hin kontinuierlich an. Diesem flachen Anstieg folgt zwischen 130. und 150. Fütterungstag ein steiler Anstieg des TdR-³H-MI. Für den 0., 10., 40., 70., 90., 110., 120., 130., 140. und 150. Fütterungstag fanden sich Mittelwerte von 0.33, 0.85, 1.97, 2.22, 3.80, 2.70, 3.65, 3.76, 8.87 und 21.00% (Tab. 1 und Abb. 1).

5.2a. Der TdR-³H-MI in der regenerierenden Leber.

24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie zeigt der TdR-³H-MI der Hepatocyten nach Pulsmarkierung während der DÄNA-Carcinogenese folgenden Verlauf: Einem starken Abfall zwischen Fütterungsbeginn und 10. Tag folgt ein Anstieg zu einem Plateau zwischen 30. und 90. Tag. Nach einem zweiten Abfall zwischen 110. und 130. Tag deutet sich am 140. Tag ein erneuter Anstieg an. (Für den 150. Tag kann kein Wert angegeben werden, da kein Tier eine 2/3-Hepatektomie am 150. Tag überlebte.) Für den 0., 10., 30., 50., 70., 90., 110., 120., 130. und 140. Fütterungstag fanden sich Mittelwerte von 23.00, 10.38, 15.93, 15.97, 14.70, 16.09, 10.97, 10.92, 11.97 und 15.97% (Tab. 2 und Abb. 1).

5.2b. Topik der markierten Hepatocyten in der regenerierenden Leber.

Während der DÄNA-induzierten Carcinogenese ändert sich die 24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie untersuchte Topik der S-Phasen-Zellen in charakteristischer Weise: Am 10. Fütterungstag imponiert vor allem die starke Abnahme DNS-synthetisierender Zellen in den zentralen und intermediären Läppchenabschnitten. Gleichzeitig nehmen diese Zellen im peripheren Läppchendrittel zu. Am 30. Tag findet man weiterhin nur sehr wenige S-Phasen-Zellen im zentralen Läppchendrittel, demgegenüber treten im intermediären Läppchendrittel die S-Phasen-Zellen in gleicher Häufigkeit wie bei der Kontrollgruppe auf. Im peripheren Läppchendrittel haben die DNS-synthetisierenden Zellen gegenüber dem 10. Tag noch weiter zugenommen. Die Topik der S-Phasen-Zellen am 70. Tag gleicht der Topik, wie sie bei der Kontrollgruppe gefunden wurde. Am 110. Tag erkennt man deutlich eine weitere Zunahme der S-Phasen-Zellen im zentralen Läppchendrittel und eine weitere Abnahme dieser Zellen im peripheren Läppchendrittel. Am 140. Tag schließlich liegt das Häufigkeitsmaximum der S-Phasen-Zellen nicht mehr in der Läppchenperipherie sondern in den beiden zentralen Läppchendritteln (Tab. 3 und Abb. 2-8).

5.2c. DNS-Synthesewelle in der regenerierenden Leber am 72. Fütterungstag.

Während der DÄNA-induzierten Carcinogenese ändert die einer 2/3-Hepatektomie folgende DNS-Synthesewelle ihren Verlauf: Am 72. Fütterungstag imponiert trotz unterschiedlicher Intervalle zwischen Operation und radioaktiver Versuchszeit bei den einzelnen Gruppen eine ähnliche Topik der S-Phasen-Zellen. Ein "peak" der DNS-Synthese, wie er normalerweise 20 bis 24 Stunden nach einer 2/3-Resektion gefunden wird, tritt am 72. Tag der DÄNA-Carcinogenese nicht mehr auf (Tab. 4 und Abb. 9-13).

5.3. Hyperbasophile Bezirke.

Am 140. Fütterungstag wurden in der ruhenden und in der regenerierenden Leber scharf begrenzte, hyperbasophile Bezirke mit einem hohen Gehalt an diploiden Zellkernen gefunden (Bilder 1-3). Diese Bezirke unterscheiden sich vom restlichen, zum Teil hypobasophilen Parenchym auch durch ihren hohen Gehalt an S-Phasen-Zellen.

Bei 2 Tieren wurde nach einer 2/3-Hepatektomie am 140. Tag und nach einer 24 Stunden folgenden Pulsmarkierung der TdR-³H-MI getrennt für hyper- und hypobasophile Bezirke bestimmt. Von jedem Tier wurden in 6 hyperbasophilen und in 6 hypobasophilen Bezirken je 1000 Hepatocyten gezählt. Dabei ergaben sich für hyper- und hypobasophile Bezirke Mittelwerte des TdR-³H-MI von 32.25 bzw. 5.73%. Bemerkenswert sind die geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Bezirken (Tab. 5).

6. Diskussion.

6a. Versuch einer Stadieneinteilung der DÄNA-induzierten Carcinogenese.

In einem ersten Stadium der DÄNA-Carcinogenese (etwa 0. - 30. Tag) stehen der toxische Effekt auf das Läppchenzentrum und Kompensationszeichen in der Läppchenperipherie ganz im Vordergrund. Die basale Proliferationsaktivität nimmt zu. Das Verhalten der induzierbaren Proliferationsaktivität in diesem Stadium kann vorerst nicht beurteilt werden: Die Abnahme des TdR-³H-MI in der regenerierenden Leber wäre einerseits erklärbar durch eine Abnahme der induzierbaren Proliferationsaktivität, andererseits könnte eine zeitlich verzögerte DNS-Synthesewelle zum gleichen Bild führen. Während der Regeneration ist die DNS-Synthese im Läppchenzentrum gestört. Die Läppchenperipherie antwortet hierauf mit einer gesteigerten DNS-Synthese.

Die bei kontinuierlicher DÄNA-Gabe von Rajewsky (1967) und Friedrich-Frekxa (1970) in der ruhenden Leber beschriebene initiale Depression der S-Phasen-Zellen (Siehe S. 21) wurde in den hier vorgelegten Untersuchungen nicht gefunden. Nach in vitro-Versuchen von Rajewsky hält diese initiale Depression 3 bis 5 Tage an. Es ist anzunehmen, daß am 10. Fütterungstag, dem ersten Zeitpunkt unserer Untersuchungen nach Fütterungsbeginn, die initiale Depression durch das Einsetzen von Kompensationsmechanismen bereits verdeckt ist.

Mit dem Rückgang der Toxizitätszeichen beginnt ein zweites Stadium, welches die Verhältnisse zwischen 30. und 90. Tag charakterisiert: Die basale Proliferationsaktivität nimmt weiterhin zu. Der Anstieg des TdR-³H-MI in der regenerierenden Leber erklärt sich auf Grund der topischen Untersuchungen eindeutig durch eine Zunahme der S-Phasen-Zellen im Läppchenzentrum. Dies ist der Ausdruck einer gesteigerten induzierbaren Proliferationsaktivität. Das Plateau, das bei der Bestimmung des TdR-³H-MI 24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie zwischen 30. und 90. Tag auftritt (Siehe Abb. 1), ist mit einem weiteren Anstieg der induzierbaren Proliferationsaktivität vereinbar, da die DNS-Synthese in diesem Stadium der DÄNA-Carcinogenese verzögert einsetzt.

Die Zunahme der basalen Proliferationsaktivität scheint nicht zu einer vermehrten Zellzahl zu führen, vielmehr einen vermehrten Zellverlust zu kompensieren: Während der Carcinogenese mit 5 mg DÄNA/kg/Tag bleibt der numerische Anteil der Hepatocyten an der Gesamtzellzahl konstant, obwohl die Bindegewebszellen während der DÄNA-Carcinogenese in ihrem Proliferationsverhalten kaum beeinflußt werden (Côté et al. 1962, Rajewsky 1967).

In einem dritten Stadium (90. - 130. Tag) imponieren bereits makroskopisch multipel disseminierte, hyperplastische Knötchen. Während in der ruhenden Leber die Häufigkeit der S-Phasen-Zellen weiterhin zunimmt, nimmt sie in der regenerierenden Leber (24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie) immer mehr ab. Man könnte dementsprechend auf eine weitere Zunahme der basalen und eine Abnahme der induzierbaren Proliferationsaktivität schließen. Ebenso

denkbar wäre jedoch ein beginnendes autonomes Wachstum mit einer ständig zunehmenden endogenen Proliferationsaktivität bei einer abnehmenden induzierbaren Proliferationsaktivität und einer nur geringfügig veränderten basalen Proliferationsaktivität. Bemerkenswerterweise treten plötzlichliches Überwiegen der läppchenzentralen DNS-Synthese gegenüber der läppchenperipheren DNS-Synthese (24 Stunden nach 2/3-Hepatektomie) und Abnahme der induzierbaren Proliferationsaktivität zur gleichen Zeit auf. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß bei der gegebenen Versuchsanordnung ein Abfall der induzierbaren Proliferationsaktivität durch eine Verzögerung der DNS-Synthesewelle in der regenerierenden Leber vorgetäuscht sein könnte.

Das vierte und letzte Stadium ist schließlich durch autonomes Wachstum charakterisiert. Hierfür scheinen die hyperbasophilen Bezirke verantwortlich zu sein. Diese zeichnen sich ja bereits in der ruhenden Leber durch einen hohen Gehalt an S-Phasen-Zellen aus. Mit der Ausbreitung der hyperbasophilen Bezirke wird das Wachstum des Leberparenchyms immer mehr durch eine endogene Proliferationsaktivität bestimmt. Gleichzeitig geht den Hepatocyten die induzierbare Proliferationsaktivität verloren. Es sind keine topischen Unterschiede mehr feststellbar. Ferner müßte sich durch Zunahme der hyperbasophilen Bezirke der TdR-³H-MI im Gesamtparenchym von ruhender und regenerierender Leber immer mehr dem TdR-³H-MI der hyperbasophilen Bezirke nähern. Ein solches Verhalten ist in unseren Ergebnissen angedeutet: Ab dem 130. Tag steigen die TdR-³H-MI-Kurven von ruhender und regenerierender Leber steil an (Abb. 1). Man kann sich gut vorstellen, daß beide Kurven einem für die hyperbasophilen Bezirke gefundenen Wert von 32% zustreben.

6b. Eigene Beurteilung der Versuche.

Von Interesse wäre der eigentliche Grund für die während der DÄNA-Carcinogenese veränderte DNS-Synthese: Auslösende Faktoren könnten Verschiebungen im Verhältnis t_S/t_C - dies zum Beispiel durch eine veränderte DNS-Syntheserate - sein, daneben wäre aber auch eine veränderte Wachstumsfraktion - zum Beispiel durch den Wiedereintritt von G_0 -Zellen in den Zellcyclus - denkbar. Beide Mechanismen sind für Mamma-Tumoren der C3H-Maus beschrieben worden (Bresciani 1964).

Eine weitere Frage ist die nach dem Schicksal der S-Phasen-Zellen während der Carcinogenese. Die DNS-Synthese kann gefolgt werden von einer endomitotischen Polyploidisierung, von einem temporären Auflaufen der Zellen in der G_2 -Phase, schließlich von einem Eintritt in die Mitose. Eine endomitotische Polyploidisierung und ihr Gegenteil, ein amitotischer Umschlag, ferner ein erhöhter Mitoseindex sind von Grundmann und Sieburg (1962) beschrieben worden.

Aus eigener Sicht werden die bisher beschriebenen Versuche nur als orientierende Untersuchungen angesehen. Es blieben vor allem zwei Punkte unberücksichtigt:

1. Die Inhomogenität der zellulären Zusammensetzung des Leberparenchyms während der DÄNA-Carcinogenese.
2. Die zeitlichen Verschiebungen und Deformierungen der DNS-Synthesewelle während der DÄNA-Carcinogenese.

Ferner kann nicht darüber Auskunft gegeben werden, wie weit die veränderte Wachstumsregulation eine veränderte Wachstumsfraktion oder einen veränderten Zellcyclus zur Folge hat. In den kommenden Versuchsteilen wird auf diese Fragen weiter eingegangen.

Tier	Tage nach Beginn der kontinuierlichen DÄNA-Fütterung									
	0	10	40	70	90	110	120	130	140	150
1	0,1	1,0	1,9	3,8	6,4	1,3	2,9	2,2	15,7	39,2
	0,3	1,1	3,1	3,2	4,3	1,6	1,9	3,7	15,5	25,7
	0,4	0,5	1,6	1,4	5,7	2,5	5,4	7,6	14,0	18,7
	0,4	1,0	2,8	3,1	2,7	4,0	7,3	3,7	13,7	6,0
	0,3	0,7	2,6	1,2	2,7	3,8	6,5	5,4	4,4	4,1
	0,6	0,9	2,5	1,7	3,6	2,7	3,4	11,4	2,5	24,2
	0,4	1,4	2,1	2,5	2,4	1,7	3,7	6,1	3,4	25,5
	0,4	1,6	2,2	3,1	5,4	1,8	5,0	2,9	3,1	20,6
	0,0	0,8	2,8	2,3	4,1	2,8	3,7	2,6	1,9	1,5
	0,3	0,5	2,2	2,4	2,3	2,5	2,2	3,1	3,4	39,6
2	0,5	0,7	1,7	2,9	4,8	3,7	4,0	3,9	1,8	27,5
	0,2	0,7	1,9	1,2	3,1	3,5	2,1	3,0	3,4	25,3
	0,5	0,5	0,8	1,2	5,0	2,7	2,9	2,8	6,0	28,4
	0,3	0,6	1,6	1,3	4,3	3,6	5,9	2,8	23,1	8,1
	0,4	0,6	2,1	1,5	2,0	2,2	2,7	4,5	13,2	27,3
	0,4	0,3	1,9	1,9	4,4	1,4	2,6	1,7	57,1	10,7
	0,3	1,1	0,9	3,1	4,8	1,3	4,2	3,2	23,9	28,3
	0,4	0,4	1,5	2,2	3,0	2,2	4,1	1,7	5,6	16,4
	0,3	1,0	1,8	3,8	6,3	6,5	4,4	2,6	1,5	
	0,2	1,0	1,6	2,2	4,9	1,4	1,1	4,5	3,2	
3	0,2	1,4	2,1	2,7	3,3	3,4	2,6	2,2	4,5	
	0,2	0,5	2,5	1,6	2,2	2,5	2,6	2,8	0,8	
	0,3	0,6	1,2	1,7	4,5	2,4	4,1	4,1	1,6	
	0,5	0,7	2,5	1,6	1,8	2,3	4,6	1,8	4,1	
	0,8	0,8	1,9	1,8	2,4	3,6	2,9	3,7	3,3	
	0,0	1,4	1,2	2,4	3,7	3,3	2,2	4,4	3,2	
	0,2	1,2	2,2	2,1	2,6	2,3	3,6	3,2	5,2	
	n	27	27	27	27	27	27	27	27	18
	$\bar{x}$	0,3	0,8	2,0	2,2	3,8	2,7	3,7	3,8	8,9
	$s\bar{x}$	0,03	0,07	0,11	0,15	0,26	0,22	0,28	0,39	2,24
	s	0,17	0,34	0,57	0,78	1,34	1,12	1,47	2,04	11,66
	150	140	130	120	110	90	70	40	10	
0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001		
40	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	0,2			
70	0,001	0,001	0,001	0,001	0,1	0,001				
90	0,001	0,05	0,95	0,7	0,005					
110	0,001	0,02	0,05	0,02						
120	0,001	0,05	0,9							
130	0,001	0,05								
140	0,005									

Tabelle 1 (Legende siehe S. 35).

Tier	Tage nach Beginn der kontinuierlichen DÄNA-Fütterung									
	0	10	30	50	70	90	110	120	130	140
1	15,5	10,1	15,5	16,1	12,5	17,8	9,9	11,4	7,8	11,9
	16,8	6,8	16,0	17,7	13,1	22,4	12,0	12,3	6,9	13,9
	15,7	8,3	14,5	9,8	12,9	20,1	11,1	11,2	7,3	16,0
	17,5	6,9	15,1	8,4	11,7	16,9	10,6	13,6	15,1	11,8
	17,8	15,6	13,1	15,3	17,5	18,5	9,1	4,0	8,0	17,9
2				12,9		17,2			6,6	11,1
	18,1	17,3	21,1	20,7	14,7	16,8	7,1	14,4	14,2	15,9
	17,7	18,7	22,3	20,0	12,7	15,7	9,7	11,6	12,5	22,8
	17,8	16,7	23,3	17,5	16,6	18,5	9,0	9,0	14,1	18,6
	29,0	8,5	24,4	13,9	19,9	19,4	7,8	8,3	12,7	14,2
3	28,5	9,0	22,1	20,4	25,5	18,6	6,0	8,8	12,5	15,7
				18,1		14,9			16,0	17,9
	24,9	11,2	12,9	19,0	21,0	13,3	8,3	9,0	15,8	14,9
	29,8	9,3	16,6	17,6	19,7	11,4	7,6	9,2	14,4	19,1
	29,5	8,3	18,0	13,9	9,9	13,1	16,5	8,8	10,8	12,4
4	29,6	6,9	19,1	17,0	10,4	10,3	12,5	12,9	13,9	18,6
	29,2	8,0	15,7	15,8	9,6	14,2	19,8	10,2	15,1	15,6
				13,4		10,6			11,8	19,1
	28,7	7,8	14,2		11,4		11,9	15,6		
	28,3	7,3	15,1		15,8		12,2	12,1		
5	23,4	8,7	18,2		12,6		15,3	11,1		
	18,1	7,9	18,3		15,1		12,5	11,9		
	21,5	10,5	14,9		17,0		10,4	12,2		
								11,8		
	26,1	22,5	7,9		13,5					
n	25	25	25	18	25	18	20	21	18	18
	23,0	10,4	15,9	16,0	14,7	16,1	11,0	10,9	12,0	16,0
	1,04	0,99	0,98	0,81	0,77	0,80	0,75	0,55	0,77	0,74
	5,22	4,94	4,92	3,44	3,84	3,41	3,36	2,53	3,27	3,14
	140	130	120	110	90	70	50	30	10	
0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
10	0,001	0,3	0,7	0,7	0,001	0,001	0,005	0,001		
30	0,98	0,005	0,001	0,001	0,95	0,4	0,975			
50	0,999	0,011	0,001	0,001	0,9	0,3				
70	0,3	0,02	0,001	0,005	0,3					
90	0,95	0,001	0,001	0,001						
110	0,001	0,4	0,975							
120	0,001	0,3								
130	0,001									

Tabelle 2 (Legende siehe S. 35).

Tage DÄNA	Feld zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1,64	6,33	13,35	8,11	14,55	15,17	17,47	23,57	18,42	17,42
10	0,00	0,00	2,17	3,66	7,80	11,65	16,27	23,21	31,24	22,26
30	0,00	1,00	2,97	9,84	15,33	16,05	22,90	31,82	40,64	29,02
70	3,30	5,93	17,88	15,01	15,74	20,08	23,82	25,03	28,16	20,75
110	5,13	6,97	20,96	8,69	10,73	8,13	12,84	8,84	17,97	14,47
140	8,07	15,37	8,40	14,48	17,27	12,99	9,00	3,56	11,90	10,95

Tabelle 3: Der TdR-³H-MI (%) in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie und Pulsmarkierung zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Stunden post op.	Feld zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck										Tier
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
24	1,41	8,07	4,16	13,79	23,33	24,09	25,07	26,73	38,47	15,84	1
	4,17	15,67	12,76	15,93	19,69	16,46	35,16	25,82	22,39	14,63	2
27	2,22	3,56	8,33	7,00	9,22	10,78	17,22	16,67	19,67	15,67	1
	0,00	2,78	12,10	8,65	11,18	14,89	18,48	13,79	30,55	10,26	2
30	2,22	7,17	14,36	16,13	25,00	30,83	24,00	34,90	41,51	32,74	1
	1,77	5,26	13,57	10,22	28,36	30,02	31,83	31,68	32,02	28,58	2
33	0,54	2,44	9,22	14,99	14,25	24,32	32,02	30,67	30,86	18,88	1
	1,33	0,74	4,17	8,49	99,08	7,22	17,46	16,31	11,56	23,11	2
36	1,11	12,30	12,39	15,81	28,44	30,00	28,02	25,32	34,25	31,25	1
	3,33	1,67	18,45	10,90	12,58	12,78	14,92	18,67	27,49	22,24	2

Tabelle 4: Der TdR-³H-MI (%) in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck am 72. Tag der DÄNA-Carcinogenese. Das Intervall zwischen 2/3-Hepatektomie und Pulsmarkierung variiert zwischen 24 und 36 Stunden. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Tabelle 1: Der TdR-³H-MI (%) der Hepatocyten in der ruhenden Leber 60 Minuten nach Pulsmarkierung. Die Stichprobenwerte basieren auf meanderförmiger Einzelzellauszählung von jeweils 1000 Hepatocyten. Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen zweier Stichproben erfolgte nach dem Student-t-Test.

Tabelle 2: Der TdR-³H-MI (%) der Hepatocyten nach 2/3-Hepatektomie. Die Pulsmarkierung erfolgte 24 Stunden nach der Operation. Einzelzellauszählung und Signifikanzberechnung wurden bereits für Tabelle 1 beschrieben.

Hypobasophile Bezirke				Hyperbasophile Bezirke			
Tier				Tier			
1	6,1	4,8	7,2	1	31,0	32,2	33,1
	3,4	4,6	5,2		32,5	30,3	31,2
2	6,8	6,1	6,5	2	33,1	34,5	33,8
	6,0	6,3	5,8		31,2	32,4	31,7
n		12		n		12	
$\bar{x}$		5,7		$\bar{x}$		32,2	
$s\bar{x}$		0,3		$s\bar{x}$		0,3	
s		1,1		s		1,2	

Tabelle 5: TdR-³H-MI (%) in hypobasophilen und hyperbasophilen Bezirken nach 2/3-Hepatektomie am 140. Tag der DÄNA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung. Bei zwei Tieren wurden in 6 hypobasophilen und 6 hyperbasophilen Bezirken durch meanderförmige Einzelzellauszählung jeweils 1000 Hepatocyten ausgewertet.

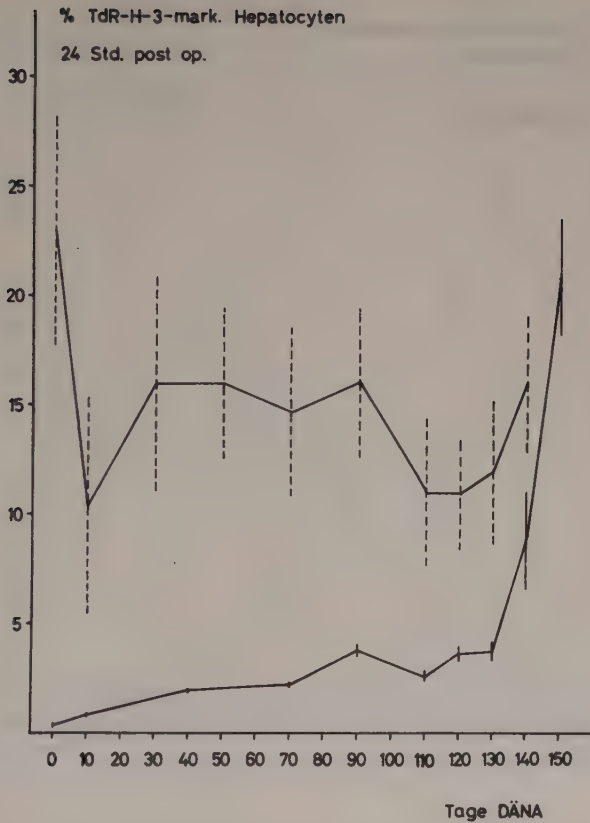


Abb. 1: Prozentsatz markierter Hepatocyten 60 Minuten nach Pulsmarkierung mit TdR- ^3H zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese in der ruhenden (untere Kurve) und der regenerierenden Leber (obere Kurve). In der regenerierenden Leber erfolgte die Pulsmarkierung 24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag.
Ordinate: TdR- ^3H -MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 1 und 2).

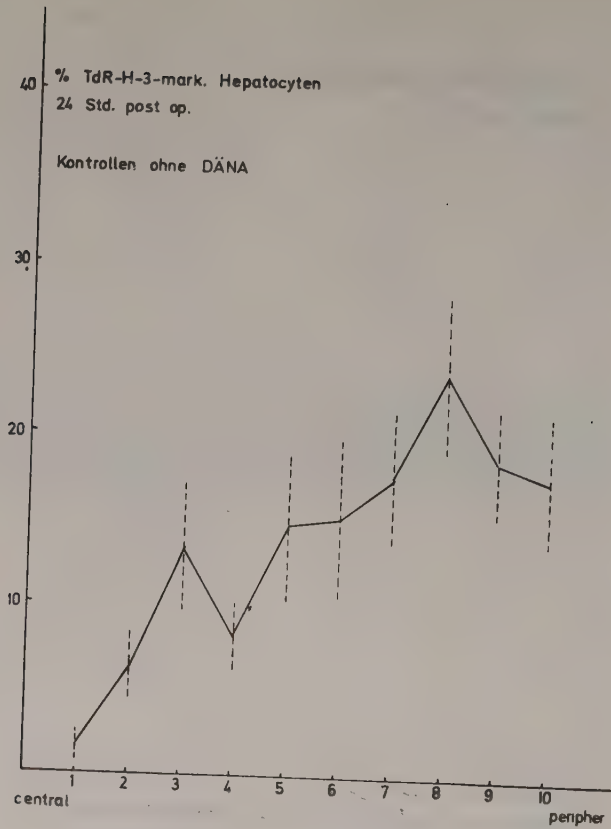


Abb. 2: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberlappchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie und 24 Stunden später folgender Pulsmarkierung mit TdR-3H bei Kontrolltieren ohne vorherige DÄNA-Gabe.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene- und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.
Ordinate: TdR-3H-MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

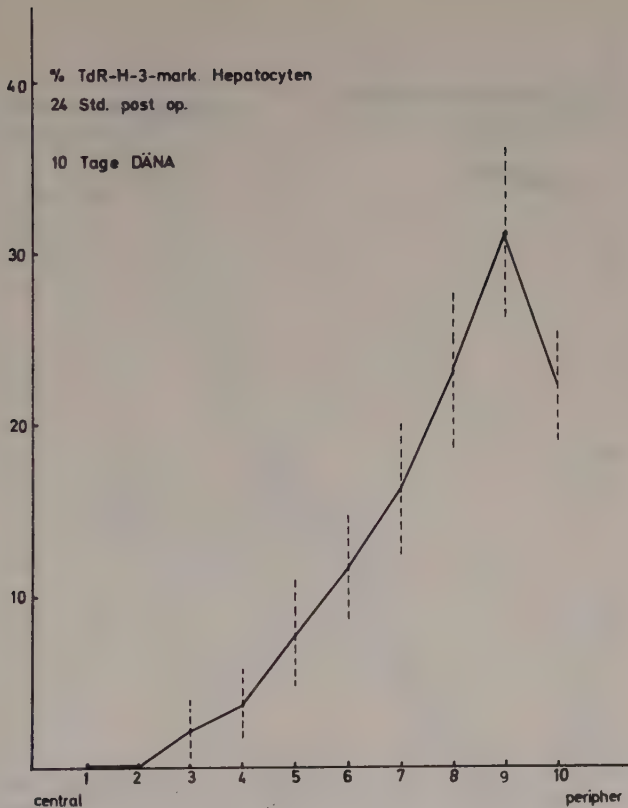


Abb. 3: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 10. Tag der DANA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit TdR-³H.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.
Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

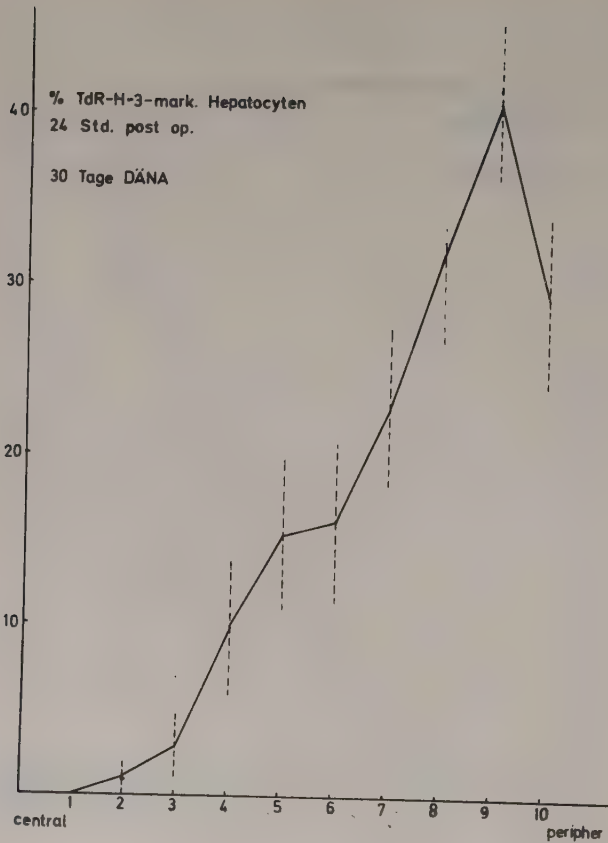


Abb. 4: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 30. Tag der DANA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit TdR- ^3H .

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.
Ordinate: TdR- ^3H -MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

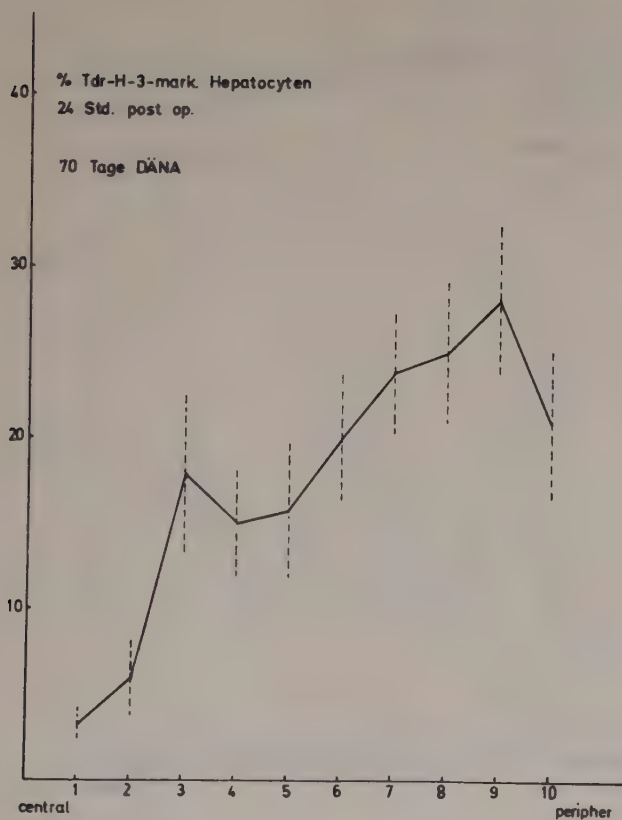


Abb. 5: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit Tdr- ^3H .

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: Tdr- ^3H -MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

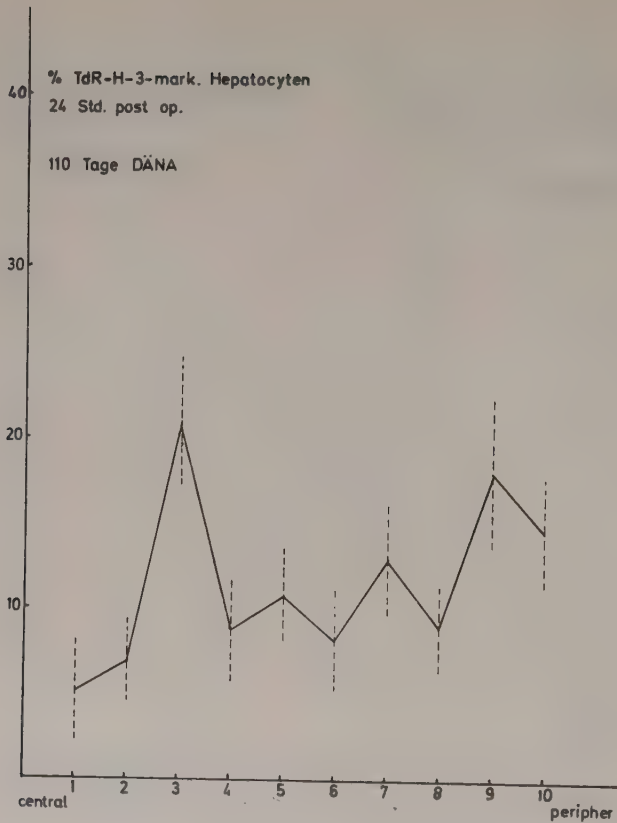


Abb. 6: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 110. Tag der DÄNA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit TdR-3H.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.
Ordinate: TdR-3H-MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

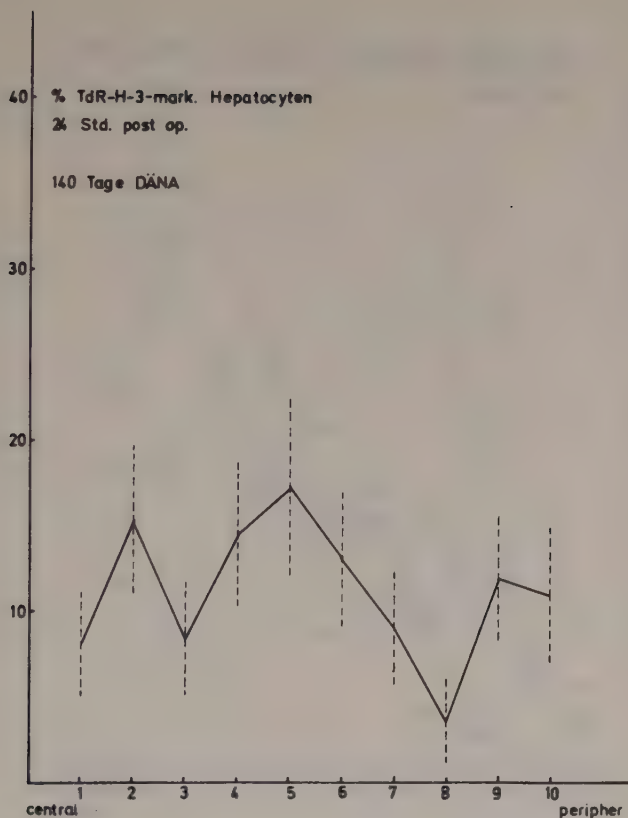


Abb. 7: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 140. Tag der DÄNA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit TdR-³H.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 3).

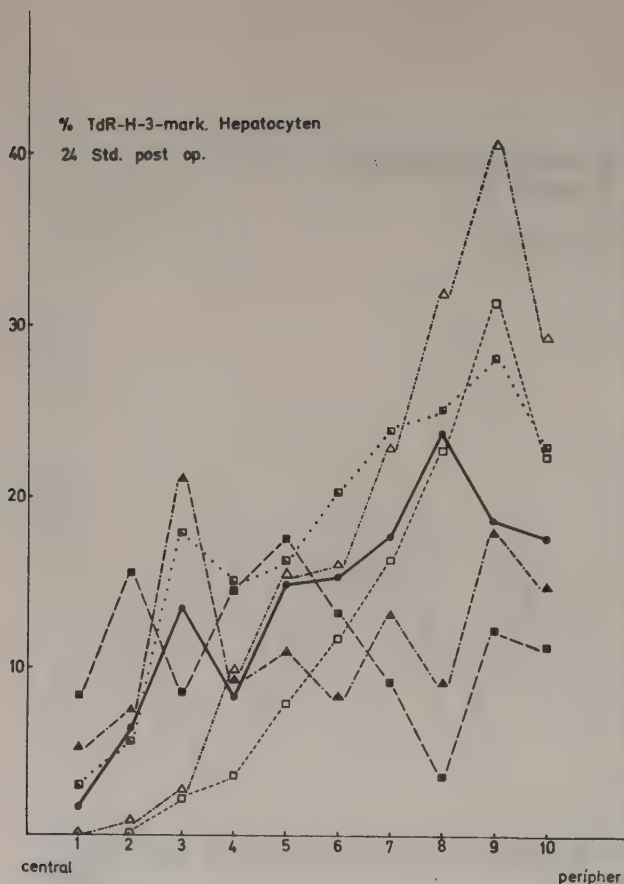


Abb. 8: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 0., 10., 30., 70., 110. und 140. Tag der DANA-Carcinogenese und 24 Stunden danach folgender Pulsmarkierung mit TdR- 3 H. (Zusammenfassung der Abbildungen 1 - 7).

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck.

Ordinate: TdR- 3 H-MI (%).

—	0 Tage DANA		70 Tage DANA
- - - - -	10 Tage DANA	- - - - -	110 Tage DANA
- . - . -	30 Tage DANA	- . - . -	140 Tage DANA

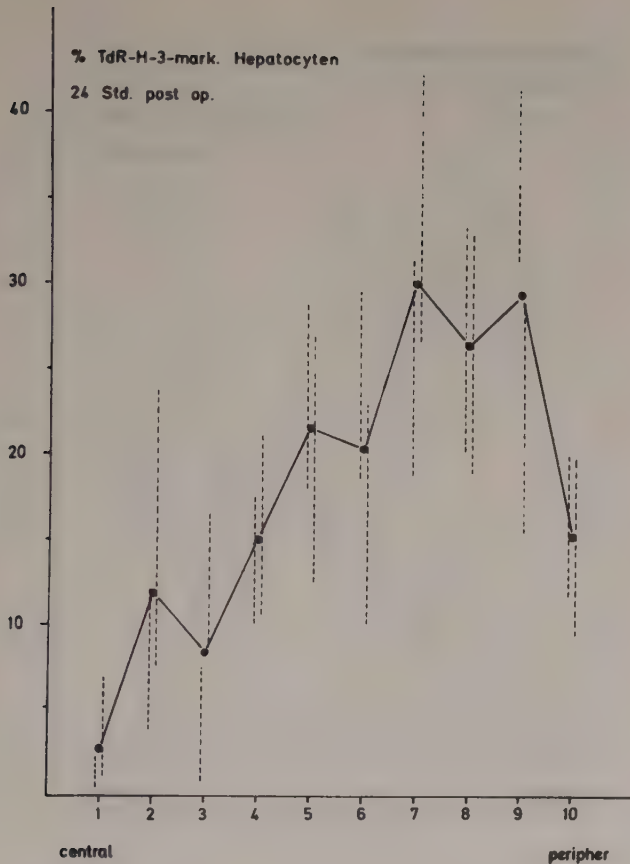


Abb. 9: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 71. Tag der DÄNA-Carcinogenese. Die TdR-³H-Pulsmarkierung erfolgte 24 Stunden nach der Operation.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-3H-MI (%) mit dem für jedes Tier
getrennt eingetragenen mittleren Fehler
des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 4).

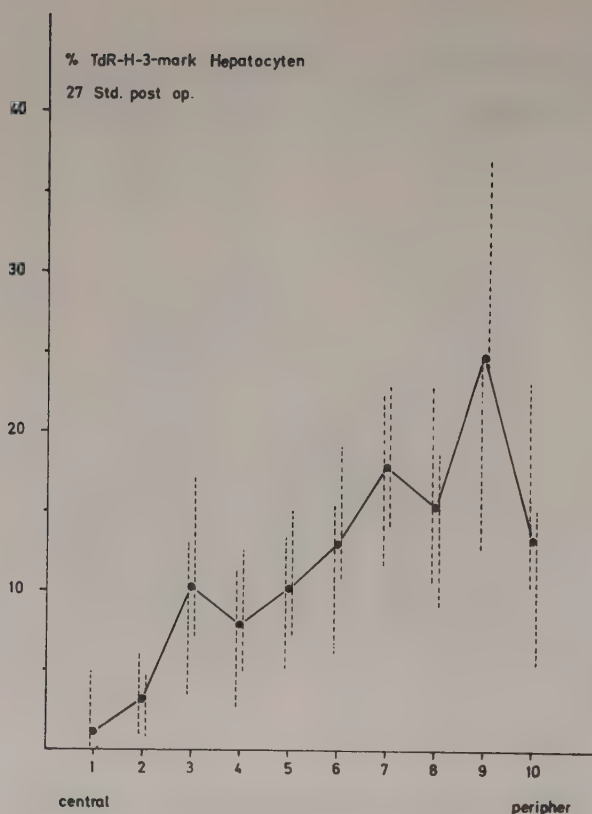


Abb. 10: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. nach 2/3-Hepatektomie am 71. Tag der DÄNA-Carcinogenese. Die TdR-³H-Pulsmarkierung erfolgte 27 Stunden nach der Operation.

Abzisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit dem für jedes Tier getrennt eingetragenen mittleren Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 4).

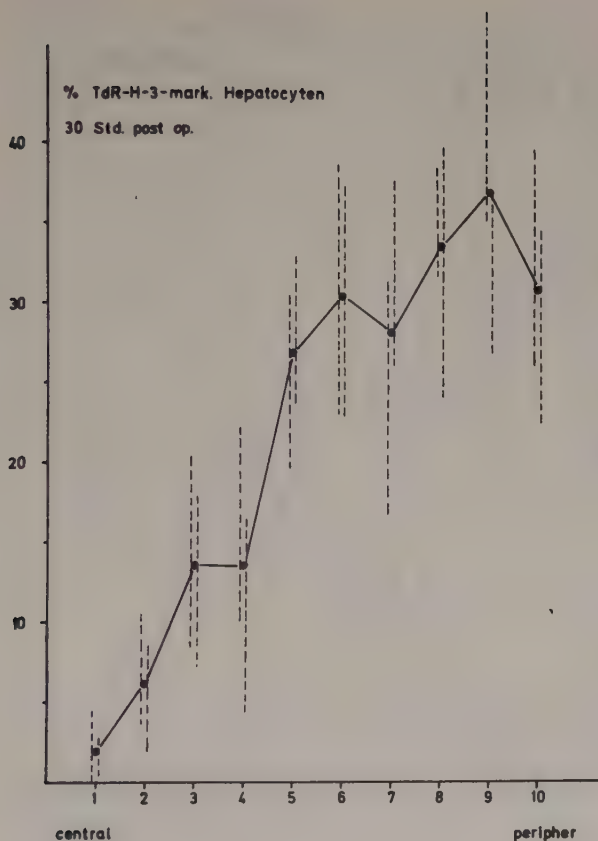


Abb. 11: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberlappchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 71. Tag der DÄNA-Carcinogenese. Die TdR-³H-Pulsmarkierung erfolgte 30 Stunden nach der Operation.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit dem für jedes Tier getrennt eingetragenen mittleren Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 4).

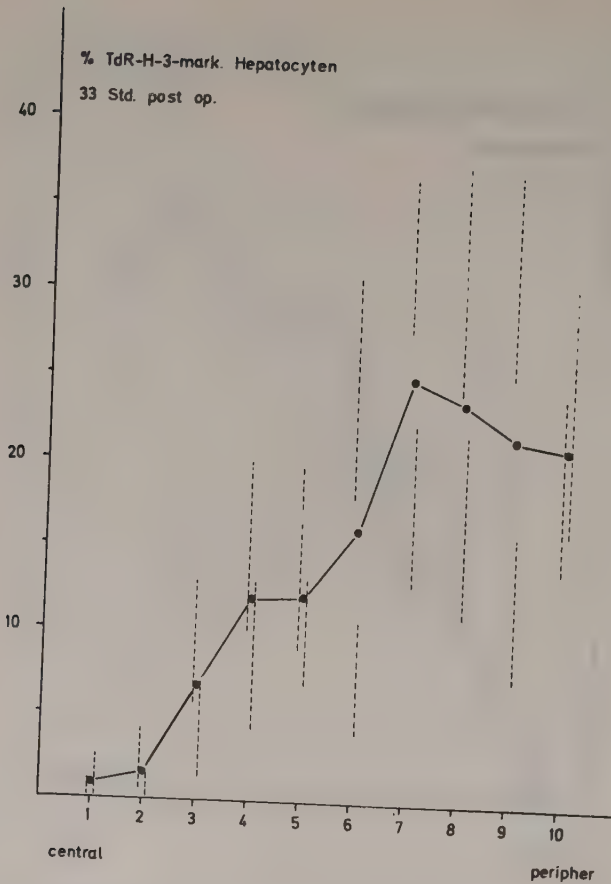


Abb. 12: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 71. Tag der DÄNA-Carcinogenese. Die TdR-³H-Pulsmarkierung erfolgte 33 Stunden nach der Operation.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit dem für jedes Tier getrennt eingetragenen mittleren Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 4).

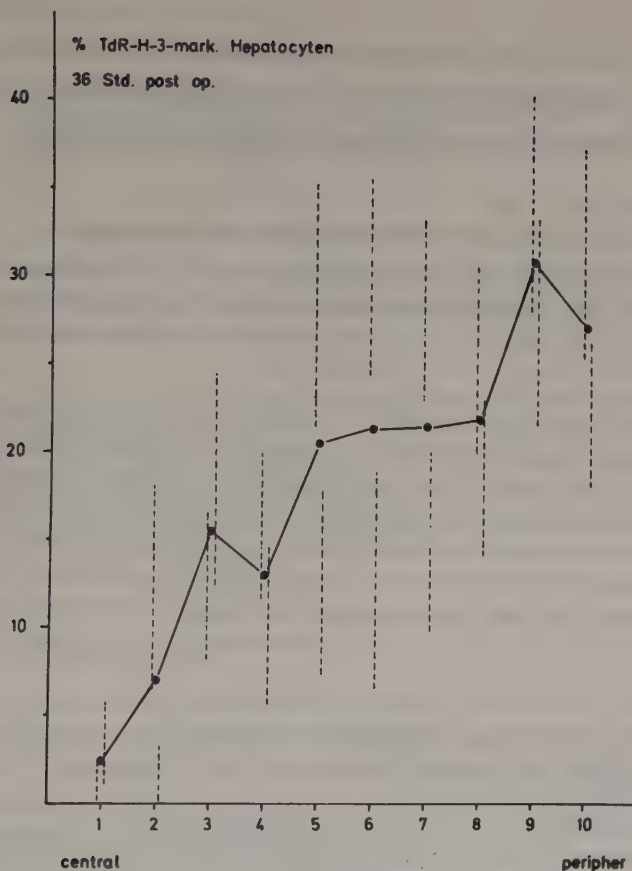


Abb. 13: Prozentsatz markierter Hepatocyten in Unterabschnitten des Leberläppchens zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck nach 2/3-Hepatektomie am 70. Tag der DANA-Carcinogenese. Die TdR-³H-Pulsmarkierung erfolgte 36 Stunden nach der Operation.

Abszisse: Felder 1 bis 10 zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck. Die Hepatocyten des Feldes 1 grenzen an die Zentralvene, die des Feldes 10 an das Glisson'sche Dreieck.

Ordinate: TdR-³H-MI (%) mit dem für jedes Tier getrennt eingetragenen mittleren Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 4).

II. HISTOCHEMISCHE AKTIVITÄT DER ADENOSIN-TRIPHOSPHATASE UND DER GLUCOSE-6-PHOSPHATASE IM LEBERPARENCHYM WÄHREND DER DÄNA-INDUZIERTEN CARCINOGENESE.

1. Vor- und Nachteile histochemischer Untersuchungen.

Ein sehr empfindlicher und morphometrisch gut faßbarer Parameter für Störungen des Funktionsstoffwechsels in der Latenzperiode ist der Schwund histochemischer Enzymaktivitäten.

Die Enzyme sind meist strukturgebunden. Einzelne Enzymdefekte weisen auf Läsionen ganz bestimmter Zellorganellen hin. Von weiterem Vorteil bei Anwendung histochemischer Methoden ist der Beibehalt der Gewebsintegrität. Andererseits muß man bei der Interpretation histochemischer Befunde beträchtliche Speziesunterschiede sowie Artefakte und Differenzen in Abhängigkeit von dem jeweils gewählten Substrat berücksichtigen (Wachstein und Meisel 1957, Wachstein 1959, Schauer 1966).

2. Charakteristik der Adenosin-Triphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase.

Die A d e n o s i n - T r i p h o s p h a t a s e (ATPase) beteiligt sich an der Hydrolyse energiereicher Phosphate. Dieser Prozeß spielt einerseits eine Rolle im Energiestoffwechsel, andererseits bei zahlreichen Synthesen, insbesondere im Protein- und Nukleinsäuren-Stoffwechsel. In der Rattenleber ist die stärkste histochemische Aktivität dieses Enzyms an die Gallenkapillaren gebunden. In den Hepatocyten zeichnen sich Zellmembran, Cytoplasma - darin besonders die peribilären Granula - und Nukleolen durch eine histochemische Aktivität der ATPase aus. Innerhalb eines Leberläppchens nimmt die Aktivität vom Periportalfeld zum Läpp-

chenzentrum hin ab (Wachstein und Meisel 1957, Wachstein 1959, Schauer 1966, Börner und Gössner 1968).

Die Mitochondrien, obwohl ATPase-haltig, zeigen am kurzfixierten Präparat keine ATPase-Aktivität. Dieses Beispiel zeigt, daß "Enzymdefekt" und "histochemische Enzymaktivität" nicht gleichzusetzen sind.

Die G l u c o s e - 6 - P h o s p h a t a s e (G-6-Pase) wurde histochemisch erstmalig in der Mäuseleber nachgewiesen (Chiquoine 1953). Als Schlüsselenzym im Kohlenhydrat-Stoffwechsel nimmt sie über die Freisetzung von Glykogen und über die Umkehr der Glykolyse an der Regulation des Blutzuckers teil. In der Rattenleber ist die histochemische Aktivität dieses Enzyms auf Parenchymzellen beschränkt. In den Hepatocyten ist die histochemische Aktivität an die glatten und rauhen Elemente des endoplasmatischen Retikulums gebunden. Das Verteilungsmuster innerhalb eines Leberläppchens gleicht etwa dem der ATPase (Wachstein und Meisel 1957, Börner und Gössner 1968).

3. Literaturübersicht.

Unmittelbar nach Beginn einer Dauerapplikation von 8 mg DÄNA/kg/Tag nehmen die histochemischen Aktivitäten beider Enzyme in den zentralen Läppchenpartien der Rattenleber ab. Nach einigen Tagen sind sie nur noch in einem schmalen, periportalen Randsaum nachweisbar. Das Aktivitätsgefälle von der Läppchenperipherie zum Läppchenzentrum hin ist kontinuierlich. Mit einer Dauerapplikation von 8 mg Thioacetamid/kg/Tag erhält man übereinstimmende Ergebnisse. Das Thioacetamid ist eine stark hepatotoxisch wirksame Substanz vom zentralen Schädigungstyp. Setzt man DÄNA oder Thioacetamid während der ersten vier Wochen ab, dann bilden sich obige Veränderungen innerhalb weiterer drei Wochen wieder voll zurück (Friedrich-Frekse et al. 1969 a).

Sowohl die Reversibilität als auch die analogen Berunde beim hepatotoxisch-wirkenden Thioacetamid führten zu der Annahme, daß diese Veränderungen toxisch bedingt sind.

Ein ähnlicher Verlust der histochemischen ATPase-Aktivität kann mit Dimethylaminoazobenzol, Tetrachlorkohlenstoff, Salmonella typhimurium (Wachstein et al. 1962) sowie durch experimentellen Verschuß der Gallenwege (Novikoff und Essner 1960) induziert werden. Die erste, histochemisch gefundene Veränderung nach einer Leberläsion durch 200 mg Thioacetamid/kg ist ein 3-4 Stunden später einsetzender Verlust der ATPase-Aktivität (Wachstein 1959). Ein weiteres Indiz für den toxischen Charakter dieser Läsionen ist das Dosis-Wirkungs-Verhältnis: Das Ausmaß dieser Veränderungen ist von der DÄNA-Dosierung abhängig (Schauer und Kunze 1968).

Das Verteilungsmuster dieser toxisch bedingten Defekte histochemischer Enzymaktivität entspricht im ausgeprägten Bild demjenigen chronischer Stauungsstraßen der Leber. Daher werden diese Defekte auch als *S t a u a s s e n* bezeichnet (Friedrich-Frekxa et al. 1969 a).

Nach einer Latenzzeit von etwa 40-70 Tagen treten während der DÄNA-Carcinogenese zuerst runde, später landkartenförmig begrenzte, scharf gegen die Umgebung abgesetzte Bezirke mit völligem Verlust der histochemischen Aktivität von ATPase und G-6-Pase auf. Im Gegensatz zu obigen Straßen werden diese Veränderungen *I n s e l n* genannt (Gössner und Friedrich-Frekxa 1964, Schauer 1966, Schauer und Kunze 1968, Friedrich-Frekxa et al. 1969 a und b, Rabes et al. 1970 a, b und c). Diese Inseln treten konzentrationsunabhängig nach einer Gesamtdosierung von 200-255 mg DÄNA/kg auf (Friedrich-Frekxa 1969 b). Sie liegen dann vor allem in zentralen Läppchenabschnitten und bestehen anfänglich aus wenigen, etwa 5-10 Zellen. Mit zunehmendem Wachstum nehmen sie in konstanter Weise im Läppchen etwa einen Sechstel-Sektor ein, welcher vielleicht einem Ast der A. hepatica entspricht (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b). Mit weiterem Wachstum ergreifen die Inseln schließlich

Besitz von einem großen Teil des gesamten Leberparenchyms ohne ersichtliche Topik.

4. Fragliche Spezifität der enzymdefizienten Inseln.

Drei Befunde an den Inseln scheinen von großer Bedeutung zu sein:

1. Die Inseln sind durch Substanzen mit alleiniger hepatotoxischer Wirkung nicht induzierbar.
2. Die Inseln stellen im Gegensatz zu den Straßen irreversible Veränderungen dar (Schauer und Kunze 1968, Friedrich-Frekse et al. 1969 b).
3. Zwischen dem ersten Auftreten der Inseln und dem ersten Auftreten von Tumoren scheint unabhängig von der DÄNA-Dosierung ein konstantes Intervall von 77-91 Tagen zu liegen (Friedrich-Frekse et al. 1969 b).

5. Fragen zur Wachstumskinetik der Inseln.

Im folgenden soll mit morphometrischen Methoden die Wachstumskinetik der Inseln untersucht werden. Unter Wachstumskinetik wird eine Gesetzmäßigkeit verstanden, nach der die Inseln in zunehmendem Maße das Leberparenchym befallen. Nicht gemeint ist hiermit die Proliferationskinetik der Hepatocyten in den Inseln. Die Untersuchung der Inseln hinsichtlich ihrer Wachstumskinetik soll vor allem der Klärung folgender Fragen dienen:

1. Ist der ständig zunehmende Anteil der Inseln am Gesamtparenchym allein dem Wachstum der schon in frühen Stadien vorhandenen Inseln zuzuschreiben oder tauchen während der Carcinogenese ständig neue Inseln auf?

2. Entstehen die Inseln durch clonales Wachstum, d. h. nach somatischer Mutation einer Zelle durch deren fortgesetzte Vermehrung, oder durch appositionelles Wachstum, d. h. aus einer Vielzahl voneinander unabhängig somatisch mutierter Zellen?

Die Versuche können im Zusammenhang gesehen werden mit einer Reihe anderer histochemischer Untersuchungen am mikrosomalen Antigen, dem Glykogen, der sauren und alkalischen Phosphatase (Friedrich-Frekxa et al. 1969 a), den unphysiologischen 3'-Monophosphatasen, den Nukleosid-5'-Monophosphatasen und Triphosphatasen (Schauer 1966), der alkalischen Phosphatase, Succinatdehydrogenase NADH-Diaphorase, Lactatdehydrogenase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Kunze und Schauer 1970), der Isocitratdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase, beta-Hydroxybutyratdehydrogenase, 6-Phosphogluconatdehydrogenase, Dihydroorotatdehydrogenase und der TPNH-Diaphorase (Stitnimankarn und Thakerngpol 1969), ferner den Ribonukleasen und Desoxyribonukleasen (Daoust und Amano 1963, Taper et al. 1971).

Erwähnt seien schließlich auch Befunde, nach denen während der DÄNA-induzierten Carcinogenese auch zuweilen Inseln mit einer erhöhten histochemischen G-6-Pase-Aktivität auftreten. Gelegentlich wurden auch Tumoren mit einer gesteigerten G-6-Pase-Aktivität gefunden (Friedrich-Frekxa et al. 1969 b, Hadjiolov und Dikow 1970).

6. Material und Methode.

36 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 100-120 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag.

Zwischen 30. und 120. Fütterungstag erhielten alle 10 Tage jeweils 2 Tiere (am 100. und 120. Fütterungstag jeweils ein Tier) TdR-³H-Injektionen nach dem in Versuchsteil III beschriebenen Schema. Zu denselben Terminen wurden je 2 Tiere (am 100. und 120. Fütterungstag nur je ein Tier) nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) 2/3-hepatektomiert

und anschließend in gleicher Weise mit TdR- ^3H injiziert. Die Tiere wurden auch für die autoradiographischen Untersuchungen des Versuchsteils III herangezogen. Hier in diesem Versuchsteil ist die TdR- ^3H -Markierung jedoch ohne Bedeutung. Mit einem Einfluß der Markierung auf die histochemischen Ergebnisse ist nicht zu rechnen. Den nicht operierten Tieren wurde mit dem Markierungsbeginn, den restlichen Tieren von der Operation an das DÄNA abgesetzt. 4 Stunden nach der letzten TdR- ^3H -Injektion (siehe Versuchsteil III) wurden nach Tötung durch Nackenschlag die Lebern entnommen.

Nach sofortiger CO_2 -Einfrierung wurden bei -20°C vom Lobus dexter lateralis eines jeden Tieres 21 unfixierte Serien-Kryostatschnitte von 5μ Dicke angefertigt. Die Schnitte 1, 4, 7, ..., 19 dienten der Herstellung von Autoradiogrammen, die Schnitte 2, 5, 8, ..., 20 zur Darstellung der histochemischen ATPase-Aktivität, die Schnitte 3, 6, 9, ..., 21 zur Darstellung der histochemischen G-6-Pase-Aktivität. In diesem Versuchsteil wurden von jedem Tier 3 aufeinanderfolgende ATPase- und G-6-Pase-Präparate untersucht.

Der ATPase-Nachweis erfolgte nach der Methode von Wachstein und Meisel (1954), modifiziert nach Schubert und Rinneberg (1962). Der G-6-Pase-Nachweis erfolgte nach der Methode von Wachstein und Meisel (1954):

Die frischen Kryostatschnitte wurden 5 Minuten getrocknet, danach unter Zusatz der jeweiligen Substratlösung für 30 Minuten bei 37°C in eine Inkubationslösung getaucht und nach Spülung in lauwarmem Leitungswasser und in Aqua dest. für genau 15 Sekunden in eine Ammoniumsulfidlösung gestellt. Nach wiederholter Aqua dest.-Spülung erfolgte 10-minütige Fixierung in Formol (10%), 10-minütiges Wässern, schließlich Eindeckung in Glycerin-Gelatine.

Die Inkubationslösung setzte sich zusammen aus:

- 10 ml Trismaleatpuffer (0,2 m, ph 7,2)
- 2,0ml Magnesiumsulfat (1,2 % = 0,1 m)

1,5 ml Bleinitrat (2%)

1,5 ml Aqua dest.

Die ATP-Lösung setzte sich zusammen aus:

10,0 mg Adenosin-5'-triphosphat (Kristallisiertes
Dinatriumsalz $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2 \cdot 3H_2O$) Boehringer,
Mannheim

5,0 ml Aqua dest.

Die G-6-P-Lösung setzte sich zusammen aus:

5,0 mg Glucose-6-Phosphat (Kristallisiertes Dinatrium-
salz $C_6H_{11}O_9PNa_2$) Boehringer, Mannheim

5,0 ml Aqua dest.

Auswertung:

In 3 aufeinanderfolgenden ATPase-Präparaten eines jeden Tieres wurde bei 60-facher Vergrößerung (Objektiv 6-fach, Großfeldokular 10-fach) die Zahl der Inseln bestimmt. Da die kleinsten, mit Sicherheit diagnostizierbaren Inseln aus etwa 5 Leberzellen bestehen, wurden die noch kleineren Enzymdefekte bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Fläche des gesamten histochemischen Präparates wurde nach geeichter diaskopischer Projektion und Abzeichnen des Bildes planimetrisch gemessen. Schließlich wurde die Zahl der Inseln je Flächeneinheit berechnet.

In jedem der 3 aufeinanderfolgenden ATPase-Präparate wurden mit einem Zeichenmikroskop (Wild Heerbrugg) bei 60-facher Vergrößerung die Konturen der beiden größten Inseln auf ein Papier projiziert und abgezeichnet. Die Fläche dieser Inseln wurde planimetrisch bestimmt.

Bei jedem dieser Präparate wurden die Flächen aller Inseln planimetrisch bestimmt. Anschließend wurde der flächenhafte Anteil der Inseln am Gesamtparenchym berechnet.

Die Inseln eines jeden Tieres wurden entsprechend ihrer Fläche in einzelne Größenklassen eingeteilt. Die Inseln mit einer Größe von 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5,26.5-27.0 planimetrischen Flächeneinheiten wurden dabei den Größenklassen 1, 2, 3, 54 zugeordnet. 10 Eichmessungen ergaben, daß eine planimetrische Flächeneinheit einer Fläche von $0,1168 \text{ mm}^2$ entspricht. Für jeden untersuchten Zeitpunkt der Carcinogenese wurde die absolute Häufigkeit der einzelnen Größenklassen bestimmt. Der Quotient aus absoluter Häufigkeit einer Größenklasse und Zahl aller Inseln ergab die relative Klassenhäufigkeit einer Größenklasse.

Bei der hier angewandten histochemischen Aufarbeitung stellten sich die ATPase-defekten Inseln wesentlich deutlicher dar als die Inseln mit einem G-6-Pase-Verlust. Daher wurden nur die ATPase-Schnitte quantitativ ausgewertet.

7. Ergebnisse.

7.1. Einfluß einer 60-stündigen Regeneration auf die Wachstumskinetik der Inseln.

Eine 60 Stunden vor Tötung der Tiere durchgeführte 2/3-Hepatektomie bleibt ohne Einfluß auf Zahl und Größe der Inseln (Tab. 9, Abb. 18, 19, 28-35). Daher dürfen im folgenden die nicht operierten und die operierten Tiere bei gleich langer DÄNA-Gabe als eine gemeinsame Gruppe betrachtet werden.

7.2. Zeitliches Auftreten von Straßen und Inseln.

Am 10. Tag der DÄNA-Carcinogenese kommen die toxisch bedingten Straßen am stärksten zur Ausbildung. Vom 30. Tag an bilden sie sich wieder zurück, indem die histochemi-

sche Enzymaktivität wieder langsam in zentrolobulärer Richtung ansteigt. Ab dem 60. Tag ist höchstens noch in einem schmalen Saum um die Zentralvene herum eine abgeschwächte Enzymaktivität erkennbar. Am 30. Tag tauchen die ersten Inseln in zentralen Läppchenregionen auf. In der Folge wird auch die Läppchenperipherie zunehmend von den Inseln befallen. Etwa vom 100. Tag an sind keine zonalen Unterschiede mehr feststellbar. (Bilder 4 und 5).

7.3. Inselzahl je Flächeneinheit zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese.

Eine Zunahme der Inselzahl je Flächeneinheit bis hin zum 80. Tag ist deutlich erkennbar. Zwischen 80. und 120. Tag kommt es wieder zu einer geringen Abnahme der Inselzahl je Flächeneinheit (Tab.6 und Abb.14-15). Die Mittelwerte für den 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110. und 120. Tag betragen 0.55, 0.40, 4.75, 12.52, 18.85, 33.55, 21.95, 23.36, 23.48 bzw. 19.37 Inseln/cm² Leberparenchym. Der lineare Kurvenanstieg in der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 15) spricht für eine exponentielle Zunahme der Inselzahl je Flächeneinheit zwischen 30. und 80. Fütterungstag.

7.4. Fläche der beiden größten Inseln zwischen 30. und 100. Tag der DÄNA-Carcinogenese.

Die beiden größten Inseln nehmen zwischen 30. und 100. Versuchstag entsprechend einem exponentiellen Verlauf an Fläche zu (Tab. 7 und Abb. 16-17). Am 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90. und 100. Versuchstag zeigen sich Mittelwerte von 0.018, 0.035, 0.157, 0.186, 0.442, 0.744, 1.260, bzw. 2.342 mm². Die in den Abbildungen 16 und 17 eingetragenen Werte A, B, C und D beziehen sich auf Absetz-Versuche, die in dieser Arbeit nicht referiert werden.

7.5. Anteil der Inselfläche an der Gesamtfläche des Parenchyms zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese.

Der Anteil der Inselfläche an der Gesamtfläche des Parenchyms nimmt zwischen 30. und 80. Tag der DÄNA-Carcinogenese einem exponentiellen Verlauf entsprechend zu. Zwischen 80. und 120. Tag nimmt dieser Wert zwar weiterhin zu, er steigt jedoch in geringerem Maße als zuvor (Tab. 8 und Abb. 18-19). Für den 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110. und 120. Tag wurden Mittelwerte von 0.02, 0.04, 0.45, 0.80, 2.91, 7.65, 5.62, 11.40, 7.59 bzw. 18.81% (Inselfläche/Gesamtfläche) gefunden.

7.6. Häufigkeitsverteilung der Inseln entsprechend einzelner Größenklassen zwischen 30. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese.

Die einzelnen Größenklassen sind zu den untersuchten Zeitpunkten wie folgt verteilt (Tab. 9, Abb. 20-35): Am 30. und 40. Tag sind nur die kleinsten Größenklassen vertreten. Vom 50. bis 120. Tag findet man in den Histogrammen aller Gruppen einen exponentiellen Abfall (Abb. 20-27), der in den halblogarithmisch dargestellten Häufigkeitsfunktionen als linearer Abfall imponiert (Abb. 28-35). Diesem Abfall schließt sich ab dem 80. Tag in allen Gruppen ein unregelmäßiger Kurvenverlauf an. Dieser ist in den Histogrammen und Häufigkeitsfunktionen durch das Auftreten von "Lücken" charakterisiert. Hiermit ist gemeint, daß bei Vorhandensein von Inseln einer Größenklasse die Inseln der nächsthöheren Größenklasse fehlen, während noch höhere Größenklassen dann wieder repräsentiert sind. In den halblogarithmisch dargestellten Häufigkeitsfunktionen imponiert der Übergang vom kontinuierlichen, exponentiellen Verlauf zum diskontinuierlichen Verlauf als Knick. Bei den Häufigkeitsfunktionen kann auch für jedes Tier ein Winkel zwischen dem linearen Kurvenabschnitt und der Ordinate bestimmt werden. Der mittlere Winkel einer Gruppe bleibt zwischen 50.

und 70. Tag etwa gleich groß, am 80. und 90. Tag wird er zunehmend größer, zu späteren Zeitpunkten bleibt er in etwa wieder konstant. Schließlich sei noch erwähnt, daß am 120. Tag in Histogramm und Häufigkeitsfunktion dem Abfall ein Anstieg von der ersten zur dritten Größenklasse vorausgeht.

Auf die Darstellung aller Einzelwerte wird verzichtet. Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte der relativen Klassenhäufigkeiten getrennt für jedes Tier aufgeführt. Der Übergang vom kontinuierlichen, exponentiellen Verlauf zum diskontinuierlichen Verlauf liegt am 80., 90., 100., 110. und 120. Tag bei der 7., 7., 8., 9. bzw. 10. Größenklasse. Der oben beschriebene Winkel beträgt für den 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110. und 120. Tag etwa 5° , 5° , 8° , 13° , 23° , 21° , 23° und 29° . Der Übersichtlichkeit wegen wurden diese Winkel in die Abbildungen nicht eingetragen.

8. Diskussion.

8.1. Zur statistischen Auswertung von Serienschnitten.

Bei einer Interpretation der hier statistisch gewonnenen Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß nicht voneinander unabhängige Schnitte, vielmehr Serienschnitte ausgewertet wurden. Auch die kleinste Insel wird bei dieser Technik auf allen drei Schnitten eines Tieres in etwa gleicher Größe getroffen. Der Mittelwert dreier aufeinanderfolgender Serienschnitte stellt demnach nicht das Mittel dreier voneinander unabhängiger Größen dar. Durch mehrere Messungen kann hier lediglich der Meßfehler verkleinert werden. Für eine bessere Fehlerberechnung müßte man von jedem Leberlappen eines Tieres einen Kryostatschnitt anfertigen. Darauf wurde hier aus arbeits-technischen Gründen verzichtet.

Auch das Anfertigen von Stufenschnitten mit einem Abstand von weniger als 2mm zwischen benachbarten Schnitten ist problematisch: Hierbei träfe man große Inseln auf mehreren Schnitten, kleine Inseln jedoch nur auf einem Schnitt. In solchen Stufenschnitten wären demnach die großen Inseln überrepräsentiert.

8.2. Zur Abnahme der Inselzahl je Flächeneinheit in den späten Stadien der DÄNA-Carcinogenese.

Zwischen 80. und 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese deutet sich eine Abnahme der Inselzahl je Flächeneinheit an. Als Grund hierfür wäre theoretisch eine Resistenzentwicklung des bis dahin noch nicht enzymdefizienten Parenchyms denkbar. Für eine solche Resistenzentwicklung, ebenso für eine Rückbildung einmal entstandener Inseln bei fortgesetzter, kontinuierlicher DÄNA-Gabe gibt es aber keine Anhaltspunkte. Daher wird hier einer anderen Deutung der Vorrang gegeben: Die Größenzunahme der Inseln führt ab einem bestimmten Zeitpunkt zu deren Konfluktion. Zweitens geht mit der Größenzunahme der Inseln eine ständige Abnahme des Parenchyms ohne Enzymdefekt einher. Durch die Konfluktion kommt es zu einer Abnahme der Inselzahl, mit der Abnahme des nicht-enzymdefizienten Parenchyms ist einem weiteren exzessiven Aufsprießen neuer Inseln der Raum entzogen. Hiermit gut vereinbar ist auch der Befund, daß am 120. Tag der DÄNA-Carcinogenese die beiden kleinsten Größenklassen nicht mehr am häufigsten vertreten sind.

8.3. Clonale Genese oder appositionelles Wachstum der Inseln.

Aus der Flächenzunahme der beiden größten Inseln während der Latenzperiode geht hervor, daß die Inseln zwischen 30. und 100. Tag einer Exponentialfunktion entsprechend an Größe zunehmen. Während eine lineare Größenzunahme ein appositionelles Wachstum nahelegen würde, ist die exponentielle Größenzunahme ein starker Hinweis auf eine

clonale Genese der Inseln.

In Analogie zum Wachstum der zwei größten Inseln nimmt auch der flächenhafte Anteil der Inseln am Gesamtparenchym in einer ersten Phase (bis zum 80. Tag) entsprechend einer Exponentialfunktion zu. Interessanterweise breiten sich jedoch ab dem 80. Tag die Inseln in weit geringerem Maße über das restliche Parenchym aus (Siehe Abb. 19). Dies kann zum Teil mit dem immer selteneren Aufsprießen neuer Inseln erklärt werden. Entscheidend dafür scheint aber die etwa am 80. Tag beginnende Konfluktion zu sein: Es ist wahrscheinlich, daß die durch Konfluktion plötzlich entstandenen großen Inseln auf Grund nutritiver Störungen in ihren zentralen Partien keine Zellproliferation mehr zeigen. In noch späteren Stadien ist eine zentrale Nekrose histologisch eindeutig erkennbar.

8.4. Interpretation der Histogramme und Häufigkeitsfunktionen.

Es wird hier angenommen, daß in einem bestimmten Cancerisierungsstadium Inseln gleicher Größe eine etwa gleich hohe Wachstumsgeschwindigkeit haben. Dabei werden andere Faktoren, welche die Wachstumskinetik der Inseln beeinflussen könnten, wie z. B. die Lokalisation der Inseln im Leberläppchen, vernachlässigt. Bei dieser Annahme sind in den Abbildungen 20 bis 35 die größten Inseln identisch mit den zuerst aufgetretenen (=ältesten) Inseln und die kleinsten Inseln identisch mit den zuletzt aufgetretenen (=jüngsten) Inseln. Daher wird bei zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit der Inseln der Abfall in den Abbildungen 20 bis 35 flacher werden. Das Ausmaß des Abfalls wird demnach einerseits von der Wachstumsgeschwindigkeit der Inseln bestimmt. Zum zweiten wird dieser Abfall von der Anzahl neu entstehender Inseln bestimmt: Je mehr Inseln zu einem bestimmten Zeitpunkt neu auftreten, umso steiler wird der Abfall zu den Inseln sein, die kurze Zeit zuvor aufgetreten sind und damit der nächsthöheren Größenklasse angehören.

Aus dem exponentiellen Größenwachstum der Inseln und der exponentiell verlaufenden Zunahme neuer Inseln resultiert der exponentielle Abfall in den Histogrammen bzw. der lineare Abfall in den halblogarithmisch dargestellten Häufigkeitsfunktionen bis etwa zur 8. Größenklasse hin, die erstmals am 70. bis 80. Tag auftritt. Wie die Abbildungen 20-35 zeigen, ist das Inselwachstum zwischen 80. und 120. Tag diskontinuierlich. Es liegt nahe, die Veränderungen im Inselwachstum während dieses Stadiums auf drei Faktoren, nämlich Konfluktion, endogene Proliferation und zentrale Nekrosen zurückzuführen. Die Konfluktion konnte durch das Sistieren der Entstehung neuer Inseln bzw. deren Abnahme zu den späten Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese nachgewiesen werden. Die zentralen Nekrosen sind mikroskopisch erkennbar. Eine in den Inseln plötzlich einsetzende endogene Proliferation könnte mit dieser Methode jedoch nur nachgewiesen werden, wenn das Ausmaß der Nekrosen bekannt wäre.

Wie bereits erwähnt, nimmt in den Abbildungen 28 bis 35 der Winkel zwischen linearem Abfall und Ordinate ab dem 80. Tag immer mehr zu, um ab dem 100. Tag viel höhere Werte als zuvor anzunehmen. Dies wäre mit der Abnahme neu entstehender Inseln ausreichend erklärbar. Andererseits ist jedoch nicht auszuschließen, daß die erst in späten Stadien auftauchenden Inseln schneller wachsen als die in früheren Stadien entstehenden Inseln.

8.5. Weitere Argumente für und gegen die clonale Genese der Inseln (Literaturübersicht).

Die clonale Genese der Inseln machen auch andere Befunde wahrscheinlich: Bei Untersuchung des mikrosomalen Antigens, der G-6-Pase, der ATPase sowie der sauren und alkalischen Phosphatasen an ein und derselben Leber fanden Friedrich-Freksa et al. (1969 a), daß in einer Insel vorherrschend ein einziges Enzym fehlt, während die Inseln untereinander

verschiedene Enzymdefekte aufweisen. Daraus könnte man folgern, daß der entscheidende Mechanismus für die Genese der Inseln in einer einzigen Mutation zu suchen ist. Hoffmann (Zit. nach Friedrich-Freksa et al. 1969 a) zeigte, daß Colcemid, während der Carcinogenese verabreicht, das Inselwachstum hemmt. Schließlich beschreiben Scherer und Hoffmann (1971), daß nach 2/3-Hepatektomie und 21 Stunden später folgender Einmalinjektion von DÄNA und ^3H -Thymidin die Silberkorndichte nach einem 6-wöchigen Intervall in den ATPase-defekten Inseln wesentlich geringer ist als im umliegenden Parenchym. Auch dies deutet auf eine den Inseln eigene Proliferationsaktivität und damit auf die Existenz eines besonderen Zelltyps innerhalb der Inseln hin. Bei letzterer Überlegung wird jedoch vorausgesetzt, daß die Inkorporation von ^3H -Thymidin in die später als ATPase-defizient imponierenden Zellpopulationen nicht bereits zum Zeitpunkt der ^3H -Thymidin-Injektion verringert ist.

Es fehlt jedoch nicht an Argumenten, die gegen eine clonale Genese der Inseln sprechen: Eine clonale Genese setzt eine dominante somatische Mutation voraus. Die meisten somatischen Mutationen sind aber rezessiver Art. Das strenge Dosis-Wirkungs-Verhältnis (siehe S. 3) ist nur dann mit zufälligen Mutationen vereinbar, wenn mehrere, voneinander unabhängige Mutationsschritte bei der Inselbildung angenommen werden. Damit wiederum ist schwer die Beobachtung vereinbar, daß eine Einmaldosis von 10 mg DÄNA/kg, während der Regenerationsphase verabreicht, zu Inseln rührt (Scherer und Hoffmann 1971), obwohl DÄNA nach einer 24-stündigen Verweildauer im Organismus unwirksam wird.

8.6. Alternativmodelle zur clonalen Hypothese.

Lehnt man somatische Mutationen als verantwortlichen Mechanismus für die Genese der Inseln ab, so könnte man Kofaktoren-Mangel, Enzym-Inhibitoren oder Mangel eines

Enzymproteins als ursächliche Momente anführen.

In der regenerierenden Leber ist eine Zellmigration in zentrolobulärer Richtung, genauer formuliert von den Zonen 1 und 2 in die Zone 3 (Rappaport 1963) nachgewiesen (Grisham 1962). Die Häufung der Inseln im Läppchenzentrum versuchte man daher auch mit einer Zellmigration zu erklären. Es ist durchaus denkbar, daß in der Läppchenperipherie geschädigte Zellen von dort in das Zentrum wandern und ein Teil dieser Zellgruppen durch Erhöhung der Zellteilungsrate gegenüber der Abstoßungsrate die Inseln bildet.

Von anderer Seite wird die Existenz eines oder mehrerer Typen primitiver oder Protohepatocyten-Stammzellen gefordert, die als Vorläufer für Parenchym- und Gallengangszellen dienen sollen (Sneider und Potter 1969). Die fragile Bedeutung einer Transformation wurde bei der 3'-Methyldimethylaminoazobenzol-induzierten Carcinogenese erwogen, da es dort in frühen Stadien zu einer extensiven Gallengangsproliferation kommt (Price et al. 1952, Rabes et al. 1972). Es gibt aber keinen Hinweis für die Existenz eines solchen Mechanismus während der DÄNA-Carcinogenese.

8.7. Höhere Regulationsmechanismen und Inselwachstum.

Das Inselwachstum scheint - zumindest während der frühen Stadien - von höheren Regulationsmechanismen abhängig zu sein: Während der DÄNA-Carcinogenese verabreichtes Fluocortolon hemmt das Wachstum der Nukleosid-5'-Triphosphatase-defekten Inseln, 17-beta-Östradiol beschleunigt deren Wachstum (Schauer et al. 1970). Ebenso wird das Wachstum durch gleichzeitige Gabe von Antilymphocyten-Serum gefördert (Friedrich-Frekza und Hoffmann 1969). Gerade auf Grund letzterer Versuche wird vermutet, daß nicht nur gegen Tumoren, sondern auch gegen deren praeneoplastische Vorläufer eine immunologische Abwehr aufgebaut wird.

8.8. Fraglicher kausaler Zusammenhang von Inseln und DÄNA-Carcinogenese.

Um zu klären, wie weit die Inseln in einem kausalen Zusammenhang mit der Carcinogenese stehen, wird man versuchen, die Inseln sowohl räumlich als auch zeitlich mit praeneoplastischen Veränderungen zu korrelieren.

Stitnimankarn und Thakerngpol (1969) verneinen eine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Enzymmuster in humanen, hepatocellulären Carcinomen. Sydow und Fey (1969) fanden zwar eine räumliche Korrelation zwischen G-6-Pase-defekten Bezirken und herdförmiger Glykogenose, jedoch keine räumliche Korrelation zwischen histologischen, praeneoplastischen Veränderungen und Glykogengehalt. Außerdem bestanden signifikante, geschlechtsspezifische Unterschiede (siehe S. 12). Die Geschlechtsunterschiede im Enzymmuster - vielleicht bedingt durch unterschiedlichen Enzymgehalt oder durch unterschiedlichen Gehalt an Carcinogen-resistenten Isoenzymen - sind zweifelsohne ein Argument gegen den kausalen Zusammenhang von Inseln und Carcinogenese.

Im Versuchsteil III wird der Versuch unternommen, die Proliferationsaktivität mit den histochemischen Veränderungen zu korrelieren.

Tier	Tage nach Beginn der kontinuierlichen DÄNA-Fütterung									
	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1	0,79	0,36	3,40	1,25	15,52	9,58	19,88	16,47	19,93	19,86
2	0,21	0,72	1,98	2,66	23,95	53,85	18,78	30,25	9,10	18,88
3	0,61	0,25	4,93	18,93	24,00	49,24	14,03	-	15,46	-
4	0,60	0,27	8,69	27,23	11,94	21,52	35,09	-	49,44	-
$\bar{x}$	0,55	0,40	4,75	12,52	18,85	33,55	21,95	23,36	23,48	19,37

Tabelle 6: Zahl der Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität je Flächeneinheit (cm^2) zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese.

Tier	Tage nach Beginn der kontinuierlichen DÄNA-Fütterung							
	30	40	50	60	70	80	90	100
1	0,017	0,042	0,194	0,202	0,187	0,902	0,422	1,047
2	0,012	0,031	0,114	0,186	0,486	0,445	2,098	3,638
3	0,025	0,032	0,172	0,149	1,002	0,976	-	-
4	-	0,036	0,148	0,208	0,104	0,653	-	-
$\bar{x}$	0,018	0,035	0,157	0,180	0,442	0,744	1,260	2,342

Tabelle 7: Fläche (mm^2) der größten Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden die beiden größten Inseln eines jeden Präparates planimetriert.

Tier	Tage nach Beginn der kontinuierlichen DÄNA-Fütterung									
	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1	0,03	0,03	0,43	0,09	0,52	1,03	3,19	10,67	12,69	13,20
2	0,01	0,04	0,22	0,22	6,74	10,65	2,81	12,13	3,79	24,42
3	0,02	0,06	0,43	1,29	3,48	14,14	10,68	-	4,82	-
4	0,02	0,03	0,71	1,58	0,91	4,77	5,76	-	9,04	-
$\bar{x}$	0,02	0,04	0,45	0,80	2,91	7,65	5,62	11,40	7,59	18,81

Tabelle 8: Flächenhafter Anteil der Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität am Gesamtparenchym zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese in Prozent (%).

Größen- klassen	Tier-Nr. (+ = Tier wurde 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert, - = Tier wurde nicht teilhepatektomiert).													
	5 ₁ +	5 ₂ +	5 ₃ -	5 ₄ -	6 ₁ -	6 ₂ -	6 ₃ +	6 ₄ +	7 ₁ +	7 ₂ -	7 ₃ -	7 ₄ +	8 ₁ +	8 ₂ -
1	88,40	66,73	90,90	91,72	76,00	77,04	100,00	100,00	38,98	67,25	98,69	62,03	71,58	43,08
2	31,60	33,27	9,10	6,91	24,00	13,34			35,94	20,75	1,31	33,27	21,58	30,58
3				1,37		9,62			10,77	6,91		4,70	3,92	15,04
4									5,38	1,84			1,96	5,01
5									5,83	3,25			1,96	2,73
6									1,34					1,36
7									0,88					0,22
8									0,88					0,44
9														0,44
10														0,22
11														0,22
12														0,22
13														0,22
14														
15														0,22
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
26														
27														
28														
29														
30														

Tabelle 9: Relative Häufigkeit (%) einzelner Größenklassen ATPase-defizienter Inseln zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese (Fortsetzung der Tabelle auf Seite 69).

Die Tiere 5₁-5₄, 6₁-6₄,....12₁-12₂ erhielten 50, 60,....120 Tage DÄNA. Ein Teil der Tiere (+) wurde 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert, die restlichen Tiere (-) wurden nicht operiert.

Die Größenklassen 1, 2, 3,....54 entsprechen Inseln mit einer Größe von 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5,....26.5-27.0 planimetrischen Flächeneinheiten. Eine planimetrische Flächeneinheit entspricht einer Fläche von 0,1168 mm².

Tier-Nr. (+ = Tier wurde 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert,
- = Tier wurde nicht teilhepatektomiert).

8 ₃ +	8 ₄ -	9 ₁ +	9 ₂ -	9 ₃ +	9 ₄ -	10 ₁ +	10 ₂ -	11 ₁ +	11 ₂ +	11 ₃ -	11 ₄ -	12 ₁ +	12 ₂ -	Größen- klassen
66,51	50,04	20,81	62,60	45,97	51,00	26,38	46,34	23,02	35,31	44,88	36,40	17,26	10,82	1
20,63	27,77	15,32	28,82	36,48	29,03	20,57	19,67	31,60	10,06	28,18	35,00	21,29	17,38	2
9,47	14,58	13,11	7,04	9,45	11,92	15,43	14,75	15,90	8,71	12,88	11,24	26,11	16,72	3
2,23	4,16	10,65	1,01	5,40	3,22	9,72	9,51	6,01	2,01	6,44	5,62	10,84	11,14	4
0,58	1,37	11,48	0,50	-	1,61	5,14	3,93	7,40	2,01	4,02	5,00	8,03	7,54	5
0,58	2,08	4,10	-	2,70	3,22	6,29	1,30	4,62	2,67	0,80	3,74	4,81	3,93	6
-	-	7,38	-	-	-	5,71	1,30	3,23	2,01	0,80	1,25	2,01	5,90	7
-	-	2,46	-	-	-	0,56	0,32	4,17	-	0,80	0,67	1,20	3,93	8
-	-	3,27	-	-	-	1,71	-	0,45	0,66	0,40	-	0,80	3,61	9
-	-	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-	-	1,20	0,98	10
-	-	2,46	-	-	-	2,28	-	-	1,39	0,40	0,67	0,80	1,30	11
-	-	1,64	-	-	-	1,71	-	-	1,39	-	-	1,20	1,30	12
-	-	0,81	-	-	-	0,56	-	-	0,90	0,40	-	0,40	0,65	13
-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	0,90	-	-	0,40	1,64	14
-	-	0,81	-	-	-	-	-	0,45	0,66	-	-	-	0,65	15
-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,45	-	-	-	-	1,96	16
-	-	-	-	-	-	-	-	0,90	-	-	-	-	0,65	17
-	-	0,81	-	-	-	0,56	-	0,45	0,66	-	-	-	1,30	18
-	-	-	-	-	-	-	0,64	0,45	-	-	-	0,40	0,98	19
-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-	1,20	0,65	20
-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-	1,20	0,33	21
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,98	22
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	24
-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-	0,40	0,65	25
-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-	0,40	0,33	26
-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-	-	27
-	-	-	-	-	-	0,56	-	-	0,66	-	-	-	0,33	28
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	29
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	30
-	-	0,81	-	-	-	0,56	-	-	-	-	-	-	0,65	31
-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-	-	32
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33
-	-	0,81	-	-	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-	34
-	-	-	-	-	-	0,56	0,64	-	-	-	-	-	0,33	35
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	37
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	38
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	41
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	42
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43
-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-	-	0,40	-	44
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	45
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	52
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,33	54

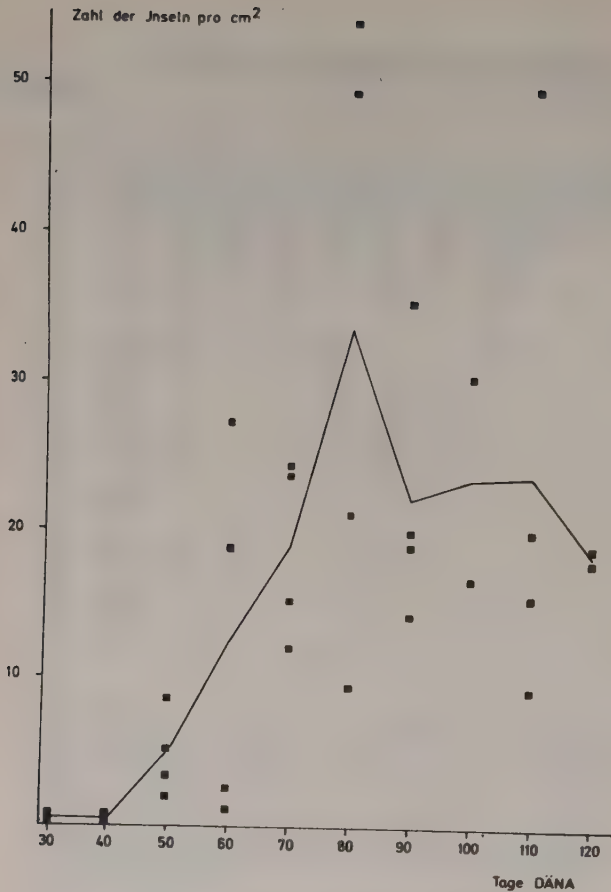


Abb. 14: Zahl der Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität je Flächeneinheit (cm²) zu verschiedenen Zeitpunkten der DANA-Carcinogenese.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DANA/kg/Tag.
Ordinate: Inseln pro cm². Eingetragen sind die Mittelwerte eines jeden Tieres. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Siehe auch Tab. 6).

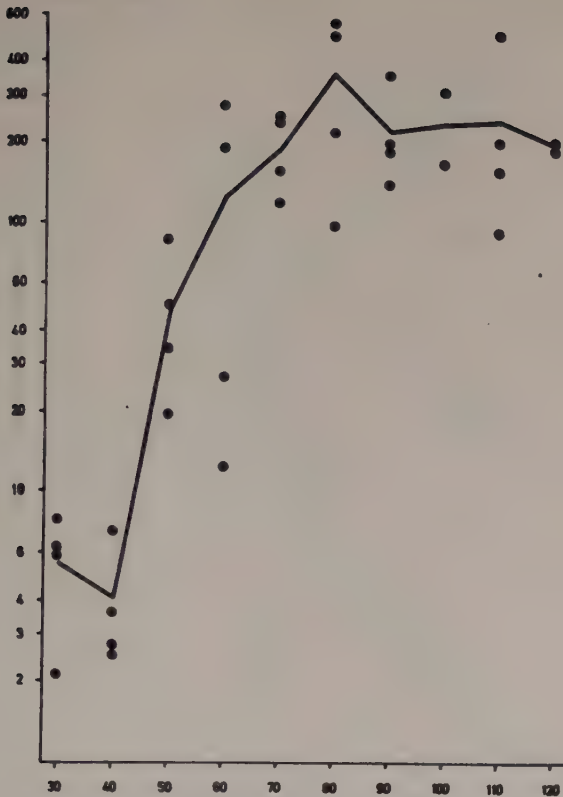


Abb. 15: Zahl der Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität je Flächeneinheit (10 cm^2) zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese (halblogarithmischer Maßstab).

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag .
Ordinate: Inseln pro 10 cm^2 . Eingezeichnet sind die Mittelwerte eines jeden Tieres. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Siehe auch Tab. 6).

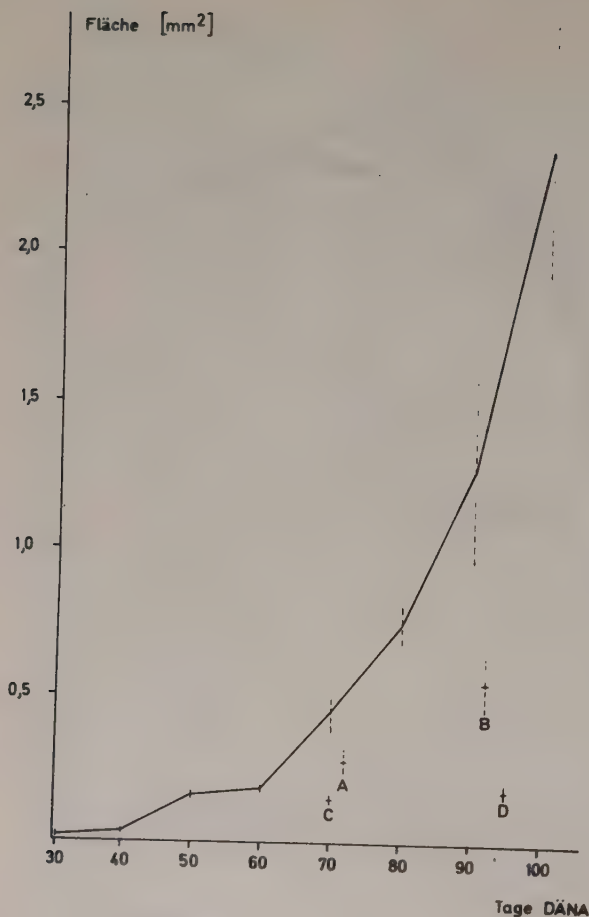


Abb. 16: Fläche (mm^2) der größten Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden die beiden größten Inseln eines jeden Präparates planimetriert.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag.
 Ordinate: Mittlere Fläche (mm^2) der beiden größten Inseln eines jeden Präparates. Die Kurve verbindet die für die einzelnen Zeitpunkte gefundenen Mittelwerte. Für jeden untersuchten Zeitpunkt ist auch der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. (Siehe auch Tab. 7.)

Die Punkte A, B, C und D beziehen sich auf Absetz-Versuche, die in dieser Arbeit nicht referiert werden.

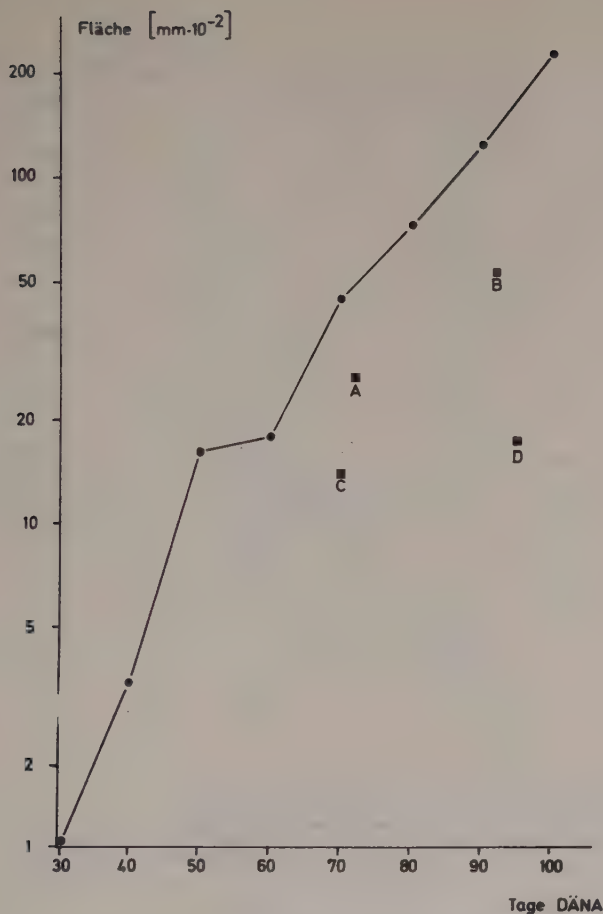


Abb. 17: Fläche ($\text{mm}^2 \cdot 10^{-2}$) der größten Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden die beiden größten Inseln eines jeden Präparates planimetriert. Darstellung im halblogarithmischen Maßstab.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag.
 Ordinate: Mittlere Fläche ($\text{mm}^2 \cdot 10^{-2}$) der beiden größten Inseln eines jeden Präparates. Die Kurve verbindet die für die einzelnen Zeitpunkte gefundenen Mittelwerte. (Siehe auch Tab. 7).

Die Punkte A, B, C und D beziehen sich auf Absetz-Versuche, die in dieser Arbeit nicht referiert werden.

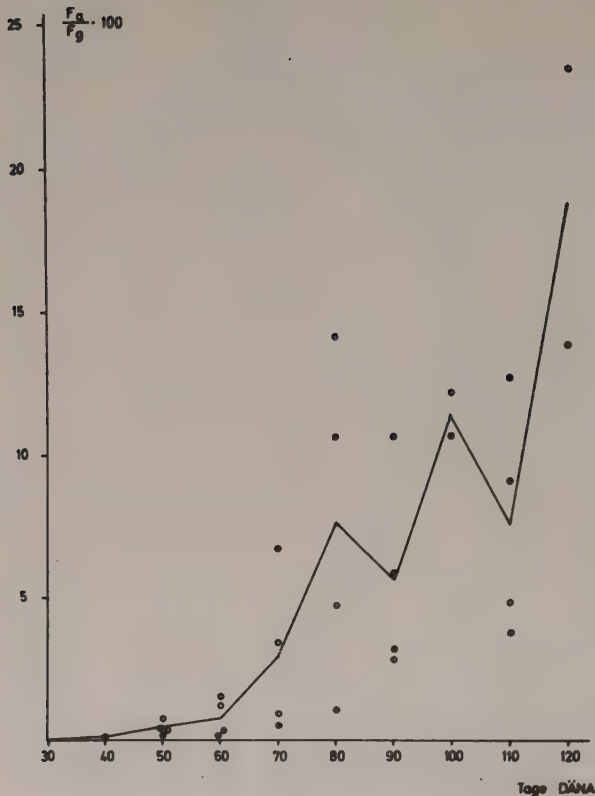


Abb. 18: Flächenhafter Anteil der ATPase-defizienten Inseln am Gesamtparenchym zu verschiedenen Zeitpunkten der DANA-Carcinogenese.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DANA/kg/Tag.
Ordinate: Prozentualer Anteil der Inseln am Gesamtparenchym. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten der einzelnen Tiere. Nicht operierte Tiere erhielten weiße Punkte. Die restlichen Tiere wurden 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert. Sie erhielten schwarze Punkte. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Siehe auch Tab. 8).

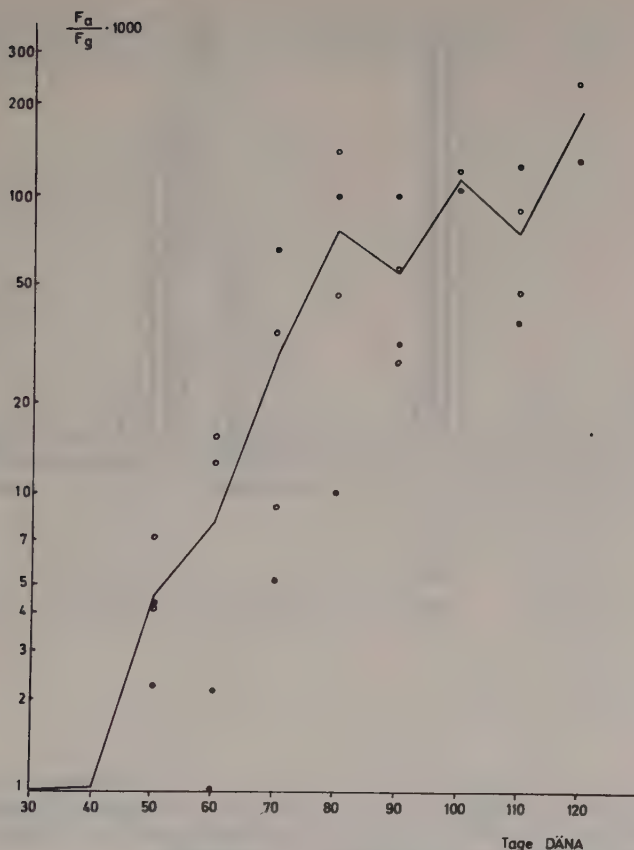


Abb. 19: Flächenhafter Anteil der ATPase-defizienten Inseln am Gesamtparenchym zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese (Halblogarithmischer Maßstab).

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag.
 Ordinate: Anteil (‰) der Inseln am Gesamtparenchym.

Die Punkte entsprechen den Mittelwerten der einzelnen Tiere. Nicht operierte Tiere erhielten weiße Punkte. Die restlichen Tiere wurden 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert. Sie erhielten schwarze Punkte. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Siehe auch Tab. 8).

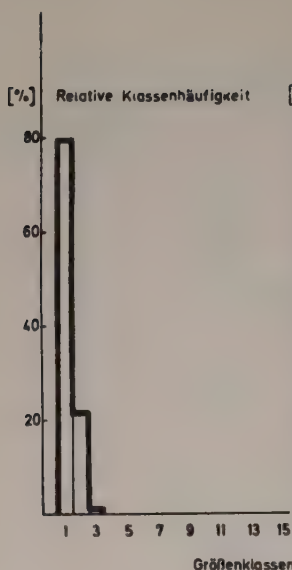


Abb. 20: 50. Tag

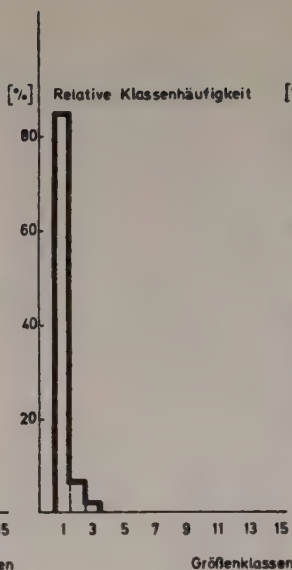


Abb. 21: 60. Tag

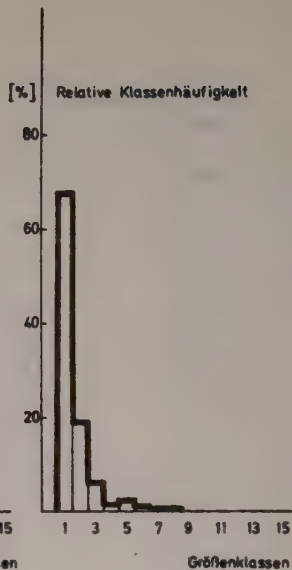


Abb. 22: 70. Tag

Abb. 20-27: Häufigkeitsverteilung der ATPase-defizienten Inseln entsprechend einzelner Größenklassen zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese.

Abzisse: Die Größenklassen 1, 2, 3, ..., 54 entsprechen Inseln mit einer Größe von 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5, ..., 26.5-27.0 planimetrischen Flächeneinheiten. Eine planimetrische Flächeneinheit entspricht einer Fläche von 0,1168 mm².

Ordinate: Relative Häufigkeit (%) einzelner Größenklassen ATPase-defizienter Inseln. Angegeben wurden die Mittelwerte von jeweils 4 Tieren (bzw. 2 Tieren in Abb. 25 und 27). (Siehe auch Tab. 9).

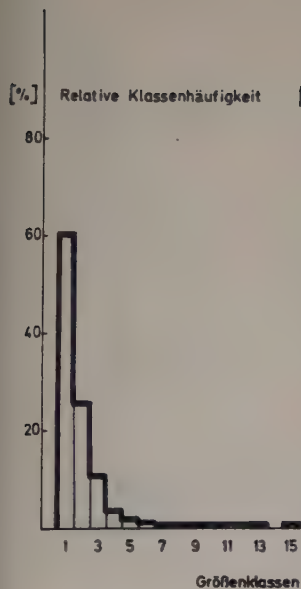


Abb. 23: 80. Tag

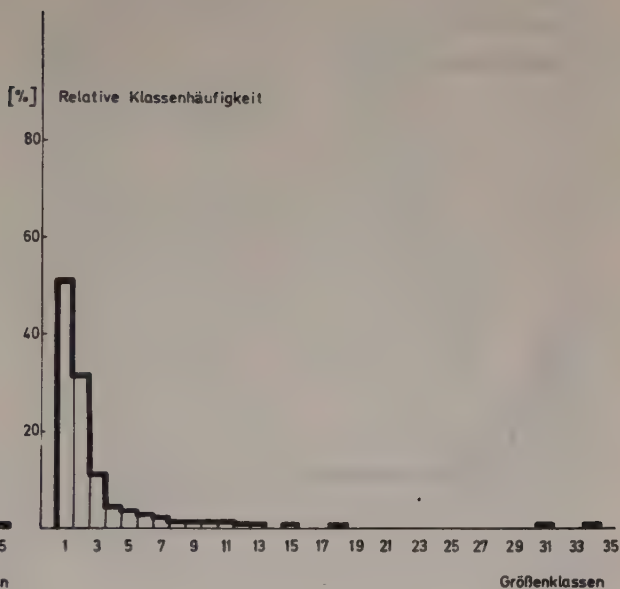
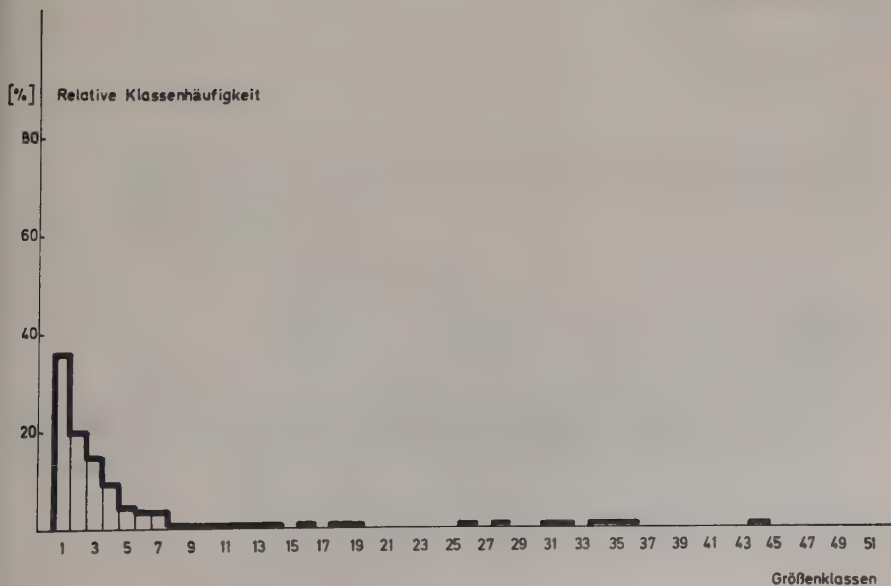


Abb. 24: 90. Tag



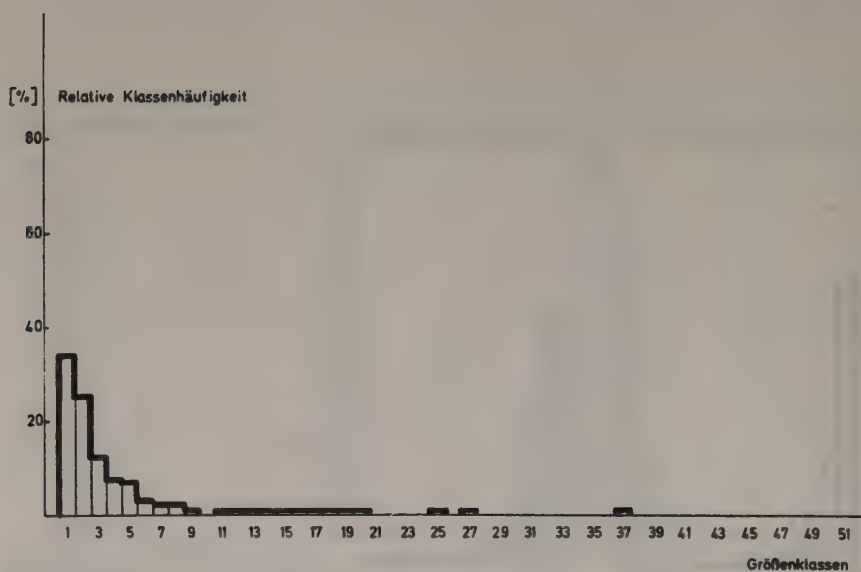


Abb. 26: 110. Tag

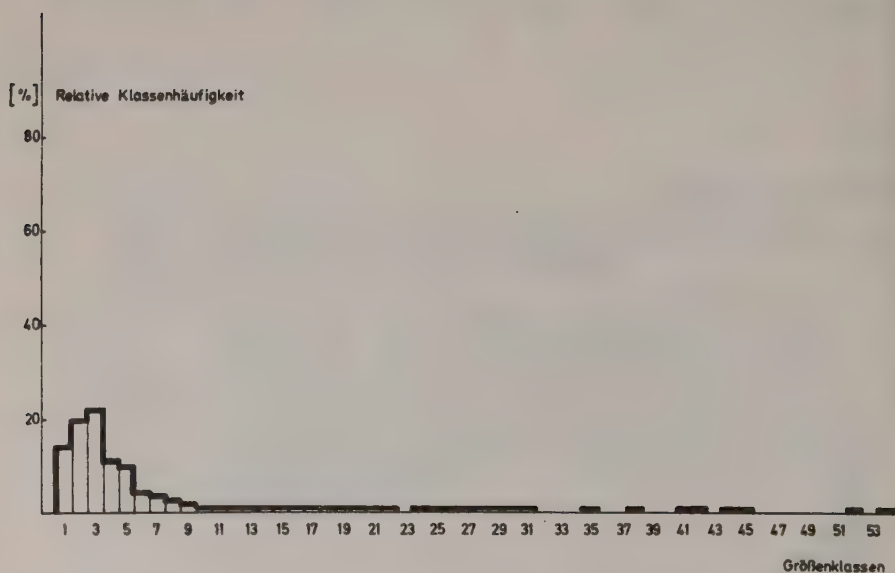


Abb. 27: 120. Tag

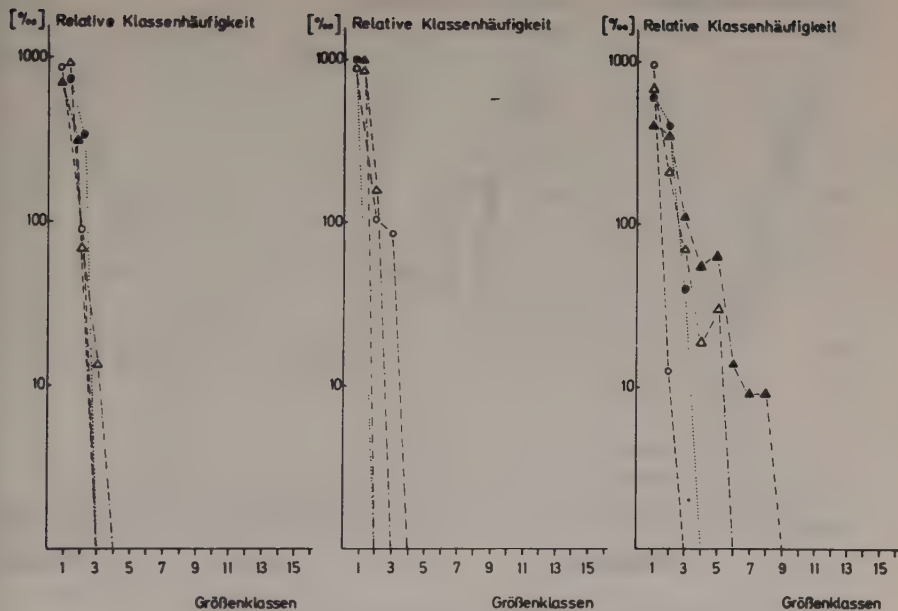


Abb. 28: 50. Tag

Abb. 29: 60. Tag

Abb. 30: 70. Tag

Abb. 28-35: Häufigkeitsverteilung der ATPase-defizienten Inseln entsprechend einzelner Größenklassen zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese (Halblogarithmische Darstellung).

Abszisse: Die Größenklassen 1, 2, 3,...54 entsprechen Inseln mit einer Größe von 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5,...26.5-27.0 planimetrischen Flächeneinheiten. Eine planimetrische Flächeneinheit entspricht einer Fläche von $0,1168 \text{ mm}^2$.

Ordinate: Die Klassenmitten der relativen Häufigkeiten ($\frac{0}{00}$) einzelner Größenklassen wurden für jedes Tier im logarithmischen Maßstab angegeben. Durch Verbindung der Punkte eines Tieres erhält man für dieses Tier die Häufigkeitsfunktion der in Größenklassen eingeteilten Inseln. Nicht operierte Tiere erhielten weiße Symbole. Tiere, die 60 Stunden vor der Tötung 2/3-hepatektomiert wurden, erhielten schwarze Symbole (Siehe auch Tab. 9).

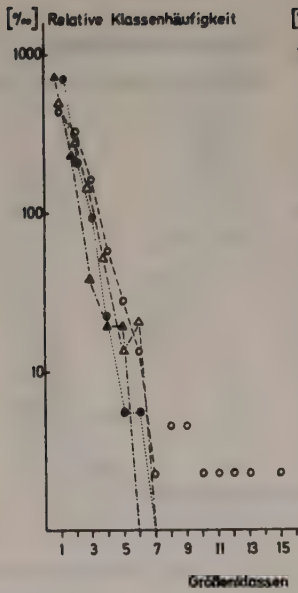


Abb. 31: 80. Tag

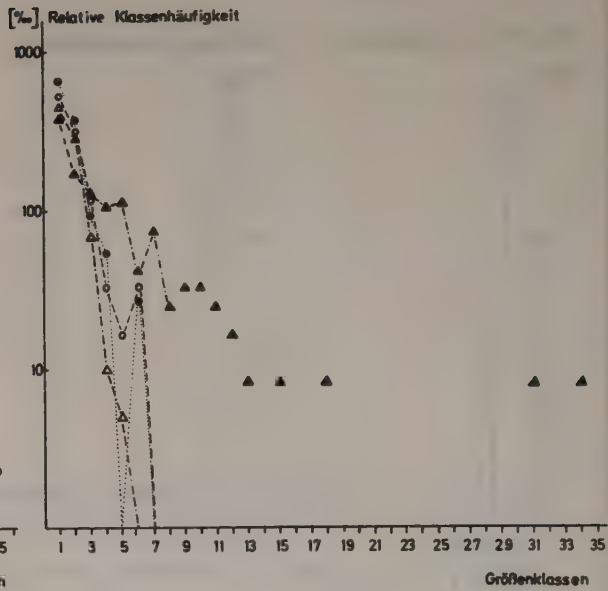


Abb. 32: 90. Tag

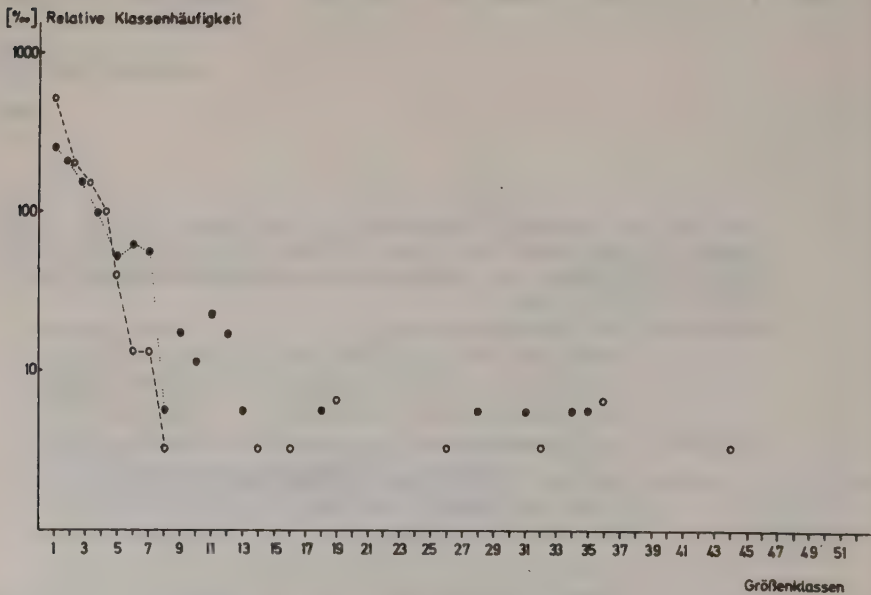


Abb. 33: 100. Tag

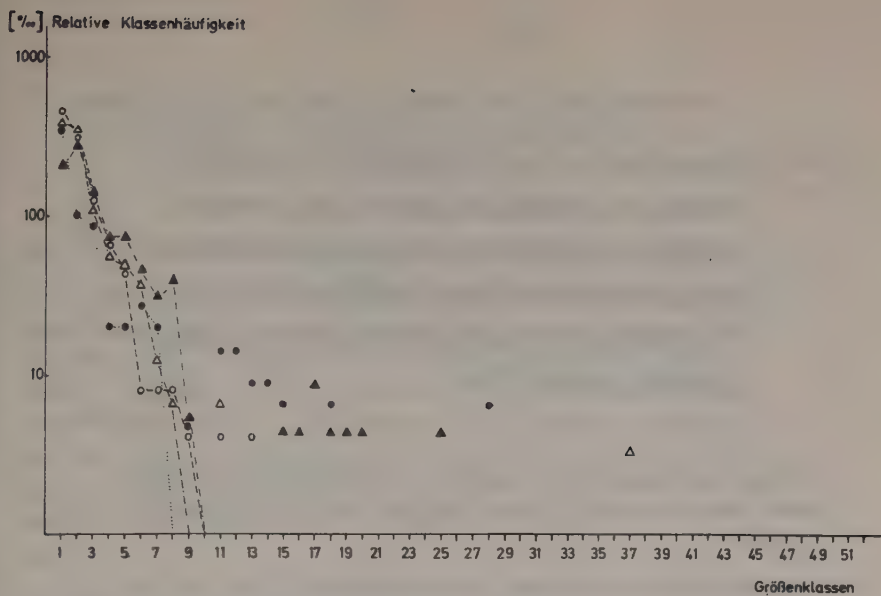


Abb. 34: 110. Tag

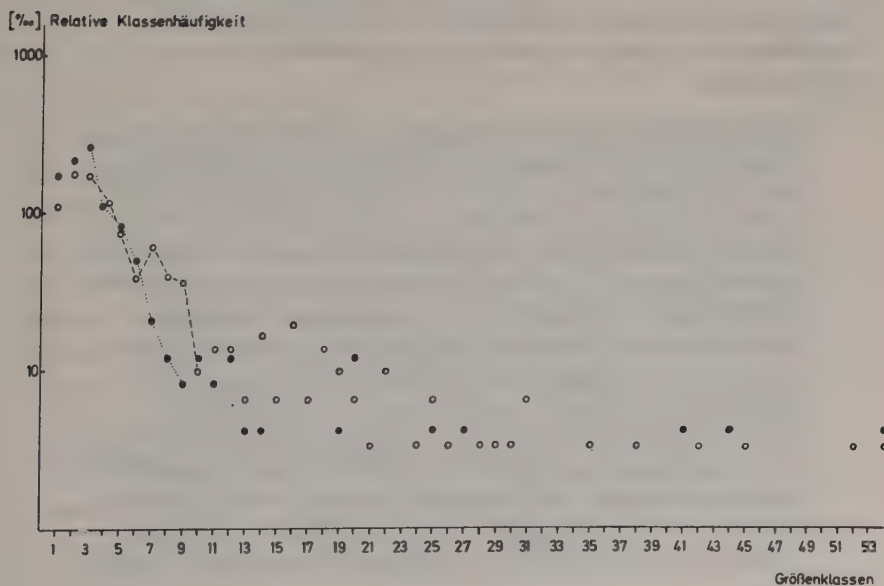


Abb. 35: 120. Tag

III. INKORPORATION VON ^3H -THYMIDIN IN GESAMTPARENCHYM UND BEZIRKE MIT DEFECT DER HISTOCHEMISCHEN ADENOSIN-TRIPHOSPHATASE-AKTIVITÄT IN DER RUHENDEN UND REGENERIERENDEN LEBER NACH MEHRFACHER MARKIERUNG WÄHREND DER DÄNA-INDUZIERTEN CARCINOGENESE.

1. Zum Nukleinsäurestoffwechsel in hyperplastischen Knötchen, hyperbasophilen Bezirken und Inseln (Literaturübersicht).

In hyperplastischen Knötchen und hyperbasophilen Bezirken findet man einen gesteigerten Nukleinsäurestoffwechsel. (s.S. 5-6). Das Auffinden analoger Veränderungen in den Inseln, vielleicht auch verbunden mit einer gestörten Wachstumsregulation, wäre ein weiterer Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang von Inseln, hyperplastischen Knötchen und hyperbasophilen Bezirken sowie deren Bedeutung für die Carcinogenese.

Nach kontinuierlicher Gabe von 4 mg DÄNA/kg/Tag ist der Cytidin-Einbau in die Hepatocyten der Inseln mit histochemischem Verlust der Nukleosid-5-Triphosphatasen- und G-6-Pase-Aktivität erhöht: Nach ^3H -Cytidin-Markierung findet man in den Inseln eine dreifach höhere Silberkorndichte über den Leberzellkernen als im umliegenden Parenchym. Im weiteren Verlauf der Carcinogenese steigt die Silberkorndichte in den Inseln immer mehr an. Ein Absetzen des DÄNA am 110. Tag bleibt hierauf ohne Einfluß (Schauer 1966). Das Verhältnis zwischen der Silberkorndichte in den Inseln und derjenigen im umliegenden Parenchym bleibt in obigem Cancerisierungsmodell bis zum 177. Fütterungstag weitgehend konstant. Dabei steigt die Silberkorndichte zwischen 71. und 177. Tag auf das 6-fache an. Der TdR- ^3H -MI ist in einigen, jedoch bei weitem nicht in allen Inseln auf das 2,7- bis 7,3-fache gegenüber dem des umliegenden Parenchyms erhöht. Zu einer weiteren starken Zunahme des TdR- ^3H -MI kommt es dann erst in den voll ausgeprägten hepatocellulären Carcinomen (Schauer und Kunze 1968). Analoge Verhältnisse zeigten

sich in Succinat-Dehydrogenase-defekten Bezirken des Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasen-papilloms der Ratte (Kunze und Schauer 1971).

2. Vorteile einer mehrfachen Markierung.

Einer Pulsmarkierung werden in diesem Versuchsteil wiederholte Einzelinjektionen von ^3H -Thymin vorgezogen. Ist das Intervall zwischen den einzelnen Injektionen kürzer als t_s , dann werden alle Zellen im Autoradiogramm als markiert erfaßt, die zwischen erster und letzter Injektion in die S-Phase eingetreten sind. Nach dieser Markierungsart erhält man denselben $\text{TdR-}^3\text{H-MI}$ wie nach einer $\text{TdR-}^3\text{H}$ -Dauerinfusion mit gleicher Länge der radioaktiven Versuchszeit.

Hierdurch werden Fehlerquellen, bedingt durch zeitliche Verschiebungen der DNS-Synthesewelle, eliminiert. Ferner gibt ein so gewonnener $\text{TdR-}^3\text{H-MI}$ eine ungefähre Vorstellung über das Verhalten der Wachstumsfraktion (Mendelsohn 1962a, 1962b) während der DÄNA-Carcinogenese.

3. Material und Methode.

65 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 100-120 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag.

Am 10., 20. und weiter alle 10 Tage bis zum 130. Fütterungstag wurden je 3 Tiere zwischen 12⁰⁰ und 13⁰⁰ Uhr 2/3-hepatektomiert (Higgins und Anderson 1931). Danach wurde das DÄNA abgesetzt und normales Trinkwasser gegeben. Die radioaktive Versuchszeit begann 20 Stunden nach den Operationen.

Zu denselben Zeitpunkten begann für je 2 Tiere ohne vorherige Operation die radioaktive Versuchszeit.

Die Kontrollgruppe (ohne DÄNA-Gabe) bestand aus drei 2/3-hepatektomierten und zwei nicht operierten Tieren desselben Stammes mit einem Gewicht von 100-120 g.

Während der radioaktiven Versuchszeit erhielt jedes Tier 7 intraperitoneale Injektionen von je 100 μ C Thymidin-6- H^3 (Spezifische Aktivität 5 C/mM, Radiochemical Centre Amersham). Das Intervall zwischen den einzelnen Injektionen betrug 6 Stunden. Die Tiere wurden 4 Stunden nach der letzten TdR- 3H -Injektion durch Nackenschlag getötet. Anschließend wurden die Lebern entnommen.

Vom Processus papillaris wurden in der auf Seite 23 (Abschnitt 3.1) beschriebenen Weise Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte gewonnen.

Nach sofortiger CO_2 -Einfrierung wurden vom Lobus dexter lateralis je 21 unfixierte Serien-Kryostatschnitte von 5 μ Dicke bei $-20^{\circ}C$ angefertigt. Die weitere autoradiographische und histochemische Präparation erfolgte in der auf Seite 55 beschriebenen Weise. Die Kryostatschnitt-Autoradiogramme wurden mit dem Stripping-Film Kodak AR 10 hergestellt, nach einer durchschnittlichen Expositionszeit von 4 Wochen entwickelt und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Mikroskopische Auswertung:

An den Paraffinschnitten wurde bei 1000-facher Vergrößerung (Okular 10-fach, Objektiv 100-fach) durch meanderförmige Einzelzellauszählung für jeweils 1000 Hepatocyten der TdR- 3H -MI bestimmt. In der Regel wurden für jedes Tier 5000 Hepatocyten ausgezählt (Siehe Tab. 10).

Die Auswertung der Kryostat-Serienschnitte geschah in folgender Weise: Autoradiogramm und benachbartes ATPase-Präparat wurden unter dem Mikroskop deckungsgleich aufeinandergelegt. Daraufhin wurde bei 450-facher Vergröße-

rung (Objektiv 45-fach, Großfeldokular 10-fach) der TdR-³H-MI selektiv für die Hepatocyten der Inseln bestimmt. Die Zahl der ausgewerteten Hepatocyten je Insel variierten in Abhängigkeit von der Größe der Inseln. Die Zahl der pro Tier ausgewerteten Inseln ist aus Tabelle 11 ersichtlich. Schließlich wurde der TdR-³H-MI des gesamten Leberparenchyms in der für die Paraffinschnitte beschriebenen Weise bestimmt.

Darüber hinaus wurde bei einigen Tieren versucht, den TdR-³H-MI der Peripherie der Inselbereiche dem des Zentrums der Inseln gegenüberzustellen. Bei einem nicht operierten Tier, welches zuvor für 90 Tage DÄNA erhalten hatte, wurde versucht, den TdR-³H-MI der kleinen Inseln dem der großen Inseln gegenüberzustellen.

4. Ergebnisse.

4.1. Der TdR-³H-MI von Gesamtparenchym und Bezirken mit Defekt der histochemischen ATPase-Aktivität in der ruhenden Leber.

In der ruhenden Leber steigt der TdR-³H-MI auch nach mehrmaliger Markierung vom Versuchsbeginn bis zu den späten Stadien der DÄNA-Carcinogenese hin an. Für den 0., 30., 50., 70., 80., 90., 100., 110., 120. und 130. Fütterungstag wurden Mittelwerte von 0.48, 7.49, 6.38, 6.91, 9.10, 12.30, 18.38, 7.02, 8.77 und 5.35 gefunden (Tab. 10). Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß diese Werte statistisch nicht gesichert sind. Dieses Ergebnis hat demnach nur orientierenden Charakter.

In den Inseln der ruhenden Leber ist der TdR-³H-MI nach mehrmaliger Markierung zwischen 50. und 80. Versuchstag höchstens geringgradig gegenüber dem des umliegenden Parenchyms erhöht. Am 90. Tag treten plötzlich Inseln mit einer starken Zunahme markierter Zellen auf. Andere Inseln

unterscheiden sich im TdR-³H-MI noch nicht vom umliegenden Parenchym. Am 130. Tag ist dann in allen Inseln der TdR-³H-MI gegenüber dem des restlichen Parenchyms stark erhöht (Tab. 11 und Abb. 37). Für den 50., 70., 80., 90., 100., 110., 120. und 130. Tag ergaben sich Mittelwerte von 9.68, 8.10, 9.03, 11.50, 24.03, 10.31, 14.84 bzw. 34.89 % (Tab. 11).

4.2. Der TdR-³H-MI von Gesamtparenchym und Bezirken mit Defekt der histochemischen ATPase-Aktivität in der regenerierenden Leber.

In der regenerierenden Leber fällt der TdR-³H-MI auch nach mehrmaliger Markierung während einem etwa zwischen 10. und 30. Tag liegenden Initialstadium stark ab. Vom 30. Tag an nimmt der TdR-³H-MI immer mehr zu, um am 110. Tag etwa wieder den Wert der Kontrolltiere zu erreichen. Zwischen 110. und 130. Tag folgt ein zweiter, tieferer Abfall (Tab. 10 und Abb. 36). Für den 0., 10., 20., 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110., 120. und 130. Tag wurden Mittelwerte von 92.00, 70.77, 62.15, 69.50, 72.81, 78.23, 69.82, 70.67, 74.79, 58.40, 80.91, 86.14, 70.54 bzw. 51.81 % gefunden (Tab. 10).

Die Inseln heben sich in der regenerierenden Leber jedoch bereits zwischen 50. und 100. Tag auf Grund ihrer Markierung vom umliegenden Parenchym ab: Der TdR-³H-MI erreicht in nahezu allen Inseln den Wert der Kontrolltiere. Im weiteren Verlauf der Carcinogenese sinkt der TdR-³H-MI, zuerst in wenigen, dann in immer mehr Inseln. Am 130. Tag zeigen operierte und nicht operierte Tiere in den Inseln einen gleich hohen TdR-³H-MI (Tab. 11 und Abb. 37). Für den 40., 50., 60., 70., 80., 90., 100., 110., 120. und 130. Versuchstag wurden Mittelwerte von 89.4, 81.2, 80.4, 92.2, 79.6, 69.8, 84.7, 72.6, 75.3 bzw. 47.5 % gefunden (Tab. 11).

Die Mittelwerte des TdR-³H-MI in den Inseln - dies gilt ebenso für die ruhende Leber - dürfen einer Beurteilung des

Wachstumsverhaltens nicht zugrundegelegt werden: Wesentlich scheint zu sein, daß alle Inseln ein autonomes Wachstum anstreben (Abb. 37). Da die einzelnen Inseln diesen Prozeß zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten einleiten, stellen die Inseln zu einem Untersuchungszeitpunkt zwischen 80. und 120. Fütterungstag kein homogenes Gewebe dar. Eine integrierende Messung muß daher abgelehnt werden.

4.3. Versuch einer differenzierteren Auswertung verschiedener Inselbereiche sowie einer selektiven Auswertung von Inseln unterschiedlicher Größe.

Der Versuch, den TdR-³H-MI getrennt für zentrale und periphere Inselbereiche zu bestimmen, wurde fallengelassen. Tabelle 12 zeigt eine solche orientierende Auswertung für ein Tier, welches 76 Tage DÄNA erhalten hatte und nach weiteren 16 Tagen getötet wurde.

Ebenso wurde darauf verzichtet, den TdR-³H-MI getrennt für große Inseln, kleine Inseln und Parenchym mit erhaltener Enzymaktivität genauer auszuwerten. Tabelle 13 zeigt für ein Tier, welches 90 Tage DÄNA erhalten hatte, lediglich den Versuch einer solchen Auswertung.

4.4. Zur Silberkorndichte.

Nach der hier gewählten radioaktiven Versuchszeit zeichnen sich die Leberzellkerne in den Inseln offenbar durch eine wesentlich geringere Silberkorndichte aus als die Leberzellkerne im umliegenden Parenchym (Bilder 6 - 8).

5. Diskussion.

5.1. "Dauerinfusion" und Wachstumsfraktion.

Die sieben aufeinanderfolgenden TdR-³H-Injektionen führen zu einem Markierungsindex wie eine 37-stündige TdR-³H-Dauerinfusion. In unseren Versuchen setzen sich diese 37 Stunden

aus dem 36-stündigen Intervall zwischen erster und siebenter Injektion und aus der 1-stündigen ^3H -Thymidin-Verfügbarkeitszeit nach der letzten Injektion zusammen.

Es gibt eine einfache Möglichkeit zur Prüfung, ob alle während der radioaktiven Versuchszeit proliferierenden Zellen markiert worden sind: Nach einer TdR- ^3H -Dauerinfusion und Tötung der Tiere 4 Stunden nach Ende der radioaktiven Versuchszeit müßten in den Autoradiogrammen alle Mitosen markiert sein. Bei genauer Durchsicht von 3 Autoradiogrammen dieser Versuchsreihe wurde auch keine einzige unmarkierte Mitose gefunden.

In der ruhenden Leber müßte der so gewonnene Markierungsindex gegenüber dem nach Pulsmarkierung erhaltenen etwa um den Faktor 3 erhöht sein.

Diese Überlegung setzt voraus, daß man eine circadiane Rhythmik vernachlässigt und die ruhende Leber als ein steady-state-System betrachtet. Ferner wird hier für die ruhende Leber ein t_g von 18 Stunden (Stöcker und Pfeiffer 1967) angenommen. Schließlich werden toxische Effekte, wie sie vielleicht nach mehrmaliger Thymidin-Injektion auftreten (Grisham 1960), vernachlässigt.

Nach diesen Überlegungen hat eine "Dauerinfusion" in der ruhenden Leber gegenüber einer Pulsmarkierung keinen Vorteil.

In der regenerierenden Leber ist die hier gewählte radioaktive Versuchszeit identisch mit der Zeitspanne zwischen 20. und 57. postoperativer Stunde. Gerade während dieser Zeit erfolgt normalerweise die hauptsächliche Leberregeneration (Grisham 1962, Stöcker 1966, Fabrikant 1968). Konnte man mit einer Pulsmarkierung in der regenerierenden Leber ein gestörtes DNS-Synthesemaximum auffinden (siehe Seite 27-28), so wird man mit der hier gewählten Markierung nach Störungen der DNS-Gesamtsynthese in der regenerierenden Leber suchen.

Demnach kann der Grund für die starke Abnahme des TdR- ^3H -MI in den ersten Tagen nach Beginn der DÄNA-Fütterung (siehe S. 86) sein:

1. Eine Abnahme der einem Wachstumsreiz folgenden DNS-Synthese. Dies wäre mit einer verminderten Regenerationsfähigkeit verbunden.

2. Eine sehr starke Verspätung der einem Wachstumsreiz folgenden DNS-Synthese. Diese könnte durch eine nahezu vollständige Aufhebung der Teilsynchronisation verursacht werden. Eine alleinige Verzögerung der DNS-Synthesewelle ist nicht anzunehmen (Siehe S. 28, Abschnitt 5.2c).

Im folgenden soll der erste Mechanismus zugrundegelegt werden. Der Prozentsatz markierter Zellen darf dann mit gewissen Einschränkungen als Maß für die stimulierbare Wachstumsfraktion herangezogen werden. Bei einer präzisen Bestimmung der stimulierbaren Wachstumsfraktion müßte jedoch berücksichtigt werden, daß die regenerierende Leber keinem steady-state System entspricht.

In der regenerierenden Leber wurde ein t_C von etwa 33 Stunden bestimmt (Rabes et al. 1972 a). Demnach werden sich während der hier gewählten radioaktiven Versuchszeit die meisten DNS-synthetisierenden Hepatocyten einmal, manche auch zweimal teilen. Ein Teil der markierten Tochterzellen wird wieder in die G₀-Phase zurücktreten und die Fähigkeit zur Proliferation zumindest vorübergehend verlieren. Diese Zellen, obwohl markiert, müssen nicht notwendigerweise der jederzeit stimulierbaren Wachstumsfraktion angehören. Der Prozentsatz markierter Zellen wird deshalb einen höheren Wert annehmen als die stimulierbare Wachstumsfraktion.

Für exponentiell wachsende Zellsysteme und weitere Systeme ohne Fließgleichgewicht sind Formeln zur Bestimmung der Wachstumsfraktion nach TdR-³H-Dauerinfusion entwickelt worden (Hempel 1968).

5.2. Versuch einer Stadieneinteilung der DÄNA-induzierten Carcinogenese aufgrund der Proliferationsaktivität in den Inseln.

Die DÄNA-Carcinogenese kann entsprechend obiger Befunde in folgende Stadien eingeteilt werden:

1. Zwischen Fütterungsbeginn und etwa 30. Tag haben die Hepatocyten im Bereich der toxisch bedingten Straßen ihre Fähigkeit zur DNS-Synthese vorübergehend verloren. In der ruhenden Leber kann diese Einschränkung der DNS-Synthese

durch eine gesteigerte DNS-Synthese in der Läppchenperipherie kompensiert werden. Der toxisch bedingte Zellverlust im Läppchenzentrum hat eine zusätzliche Steigerung der DNS-Synthese in der Läppchenperipherie zur Folge. Dieser Mechanismus zeigt in der regenerierenden Leber seine Grenzen: Nach einer 2/3-Hepatektomie ist die Läppchenperipherie offenbar nicht mehr in der Lage, die Abschwächung der Proliferationsaktivität im Läppchenzentrum voll zu kompensieren. Dieses Stadium ist demnach durch eine erhöhte basale und eine erniedrigte induzierbare Proliferationsaktivität gekennzeichnet.

2. In einem zweiten Stadium (30.-80. Tag) weichen die Straßen wieder in Richtung Zentralvene zurück. Damit einhergehend erhalten die zentralen Läppchenpartien langsam wieder ihre Fähigkeit zur DNS-Synthese. Das Maximum der DNS-Synthese liegt aber immer noch in der Läppchenperipherie. In den zentralen und intermediären Läppchenbezirken tauchen die ersten Inseln auf. Diese zeigen in der ruhenden Leber eine ebenso niedrige DNS-Synthese wie das umliegende (in der zentralen Läppchenhälfte liegende) Parenchym. Anders in der regenerierenden Leber: Hier zeigen die Inseln eine ebenso intensive DNS-Synthese wie die Läppchenperipherie oder wie eine unbehandelte Leber. Durch diese gesteigerte DNS-Synthese heben sich die Inseln vom umliegenden Parenchym ab. Aus den beschriebenen Veränderungen resultiert für das Gesamtparenchym eine Zunahme von basaler und induzierbarer Proliferationsaktivität.

3. In einem dritten Stadium (90.-120. Tag) zeigen zuerst wenige, dann zunehmend mehr Inseln in der ruhenden Leber eine gegenüber dem umliegenden Parenchym stark erhöhte DNS-Synthese. In Verbindung hiermit verlieren die Inseln die Fähigkeit, einen Wachstumsreiz mit einer zusätzlich gesteigerten DNS-Synthese zu beantworten. Solange die Inseln noch zentrale Läppchenpartien bevorzugen, verlagert sich die DNS-Synthese immer mehr von der Läppchen-

peripherie in das Läppchenzentrum. Mit der Ausbreitung der Inseln über das ganze Leberläppchen verlieren sich schließlich die zonalen Unterschiede in der DNS-Synthese. Das Ergebnis von all dem ist ein Rückgang von basaler und induzierbarer Proliferationsaktivität verbunden mit einer Zunahme der endogenen Proliferationsaktivität.

4. Ab dem 130. Tag zeigen nahezu alle Inseln ein autonomes Wachstum. Die Inseln sind damit nicht mehr den organspezifischen, homoiostatischen Wachstumsregulationen unterworfen. Die Inseln haben zugleich fast das ganze Leberparenchym befallen. Ihre Proliferationsaktivität ist daher bestimmend für das Wachstum der ganzen Leber.

5.3. Clon-Hypothese und Proliferationsaktivität in den Inseln.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuchsteils mit denen des Versuchsteils II, so taucht eine Schwierigkeit auf: Will man die Vorstellung einer clonalen Genese der Inseln weiter aufrecht erhalten, so muß man für die Inseln eine basale Proliferationsaktivität fordern, welche höher ist als die des umliegenden Parenchyms. In diesem Versuchsteil wurde jedoch betont, daß Inseln und umliegendes Parenchym in der ruhenden Leber bis zum 80. Tag im Mittel einen gleich hohen Markierungsindex aufweisen - wobei nicht auszuschließen ist, daß einzelne Subpopulationen in den Inseln einen demgegenüber erhöhten Markierungsindex haben. Für diesen Zusammenhang könnte die Zellzyclusdauer von Bedeutung sein: Wäre t_c in den Inseln wesentlich größer als im umliegenden Parenchym, dann könnte durchaus eine gegenüber der Umgebung erhöhte basale Proliferationsaktivität der Inseln mit einem nicht erhöhten Markierungsindex in Einklang gebracht werden.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Silberkorndichte über den markierten Leberzellkernen in den Inseln offenbar wesentlich geringer ist als im umliegenden Parenchym.

Demnach inkorporieren die Kerne in den Inseln während der radioaktiven Versuchszeit weniger TdR-³H als die restlichen Kerne. Die Vermutung, daß die Hepatocyten der Inseln während der radioaktiven Versuchszeit die S-Phase nur einmal und die Hepatocyten des Restparenchyms während dergleichen Zeit diese zweimal durchlaufen, liegt nahe. Dies würde aber bedeuten, daß t_C in den Inseln wesentlich größer ist als im umliegenden Parenchym.

5.4. Fragliche Bedeutung eines Blocks in der G_2 -Phase.

Eine verlängerte Cyclisdauer wäre am ehesten mit einem vorübergehenden G_2 -Block erklärbar. Nach Simard et al. (1968) sei hier folgendes Modell angeboten: In der normalen Leber bestehen ein starker G_1 -Block und ein schwacher G_2 -Block. In praeneoplastischen und enzymdefekten Hepatocyten bestehen ein schwacher G_1 -Block und ein starker G_2 -Block. Die neoplastische Transformation hat einen schwachen G_1 -Block und einen schwachen G_2 -Block zur Folge.

Eine Reihe von Befunden spricht für einen G_2 -Block in der Latenzperiode: Banerjee (1965) zeigte, daß eine Teilhepatektomie während der 4-Dimethylaminoazobenzol-Hepatocarcinogenese einen starken Anstieg des TdR-³H-MI, jedoch nur einen geringen Anstieg des Mitose-Index zur Folge hat. Entsprechend hierzu induziert 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol (Maini und Stich 1962) nach Teilhepatektomie ein Mitose-Defizit.

Die gehemmte Zellproliferation scheint nicht Folge einer Blockade während eines bestimmten Mitosestadiums zu sein: Nach Guelstein (1963) sowie Starikova und Vasiliev (1962) ist die relative Häufigkeit der einzelnen Mitosestadien während der Carcinogenese mit Kohlenwasserstoffen und Azo-Verbindungen unverändert. Simard et al. (1968) zeigten, daß es während der 4-Dimethylaminoazobenzol-Carcinogenese in den hyperplastischen Knötchen nach TdR-³H-Injektion zu einer Abnahme markierter Mitosen und einer Zunahme höherer Ploidiestufen kommt. Auch dies spricht für einen G_2 -Block. Störungen des Mitoseablaufs scheinen nach den zitierten Befunden unwahrscheinlich zu sein.

Ebenso unwahrscheinlich sind Veränderungen der S-Phasendauer. Diese können aber nicht ausgeschlossen werden.

Eine Inkonzstanz von t_s wurde von Frindel et al. (1968) in drei humanen Hauttümoren (Basaliom, epidermoides Epitheliom und Spindelzellsarkom) nachgewiesen.

5.5. Diskussion anderer Ursachen für die Abnahme der Silberkorndichte in den Inseln.

Neben einem G_2 -Block könnte man noch weitere Mechanismen als ursächliche Faktoren für die Abnahme der Silberkorndichte in den Inseln anführen: Es wäre denkbar, daß die Kerne in den Inseln eine niedrigere Ploidiestufe als die Kerne des umliegenden Parenchyms aufweisen. Ferner muß damit gerechnet werden, daß in den Zellen mit den beschriebenen Enzymveränderungen weitere Veränderungen im Enzymmuster des Nukleinsäurenstoffwechsels (siehe S. 17) und hiermit ein veränderter Salvage-Pathway (Heininger et al. 1971) einhergehen. Auf diese Weise könnte in die DNS der Enzym-defizienten Hepatocyten mehr endogenes und weniger radioaktives Thymidin eingebaut werden.

Tage DÄNA	TdR- 3 H-MI (%)	
	ohne Operation	nach 2/3-Hepatektomie
0	0,48	92,00
10		70,77
20		62,15
30	7,49	69,50
40		72,81
50	6,38	78,23
60		69,82
70		70,67
80	9,10	74,79
90	12,30	58,40
100	18,38	80,91
110	7,02	86,14
120	8,77	70,54
130	5,35	51,81

Tabelle 10: TdR- 3 H-MI (%) im Gesamtparenchym der ruhenden und regenerierenden Leber nach mehrmaliger TdR- 3 H-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese. Die angegebenen Mittelwerte basieren in der Regel auf meanderförmiger Einzelzellauszählung von 5 x 1000 Hepatocyten je Tier. Diese Werte können statistisch jedoch nicht gesichert werden.

Tage DÄNA	ohne Operation			nach 2/3-Hepatektomie		
	Tier	x	$\bar{x}$ (Z)	Tier	x	$\bar{x}$ (Z)
40				1	95,7 95,5 100,0 88,9 83,9 89,4	89,4 (142)
50	3	8,7 13,1 0,0 5,9 7,4 12,6 5,5 5,6	9,7 (475)	1	83,3 93,3 96,7 89,7 75,0 87,8	87,3 (207)
				2	70,0 69,7 75,0 71,9	71,5 (179)
60				1	83,3 75,0 90,5 81,8 72,2 80,0	80,4 (112)
70	3	10,1 10,2 9,2 14,8 1,1 4,2 9,6	8,1 (580)	1	93,2 86,5 92,7	89,3 (291)
				2	93,9 92,3 89,0 97,3 92,2 92,1 89,3 90,8 91,1 92,2 93,5 91,0 92,5 97,4	92,2 (1281)
80	3	8,2 11,6 6,5 4,8 10,5	9,0 (454)	1	82,8 86,4 90,7 36,4	74,4 (270)
				2	75,2 85,3 84,7 85,2 90,0	82,8 (989)
90	3	8,3 4,2 26,7 15,4 12,3 3,1 2,4 14,8 11,1 21,1 8,3 13,0 15,4 16,7 2,0 8,8 12,9	11,5 (1183)	1	53,5 63,7 80,9 73,4 66,0 57,7 77,1 72,4 72,5 78,2	69,8 (2518)

Tage DÄNA	ohne Operation			nach 2/3-Hepatektomie		
	Tier	x	$\bar{x}$ (Z)	Tier	x	$\bar{x}$ (Z)
100	3	14,6	18,9	1	77,4	78,5
		25,0	13,8		72,5	82,4
		32,7	0,0		88,0	82,7
		15,0	17,8		93,0	82,1
		26,9	42,8		83,1	89,2
		41,2	0,0		81,8	79,3
		9,1			72,8	77,8
			24,0 (541)		85,3	87,5
					90,8	84,9
					94,7	89,4
					90,8	
110	3	7,5	10,6	1	63,3	75,5
		7,1	16,0		60,2	75,8
		3,8	21,3		92,9	71,9
		12,2	9,6		67,4	67,1
			10,3 (485)		84,2	
120	3	15,6	17,4	1	67,0	78,0
		17,4	21,4		80,0	81,8
		12,8	12,7		75,9	62,6
		16,2			87,3	75,2
			14,8 (1206)		72,7	
130	3	32,2	31,8	1	60,6	42,0
		14,6	42,2		42,6	65,0
		47,7	42,0		47,3	42,9
		28,4	37,5		39,0	39,1
			34,9 (1771)		32,9	38,7

Tabelle 11: TdR-³H-MI (%) in den ATPase-defizienten Inseln der ruhenden und regenerierenden Leber zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung. Die Tiere 1 und 2 jeder Gruppe wurden vor der radioaktiven Versuchszeit 2/3-hepatektomiert, das Tier 3 wurde nicht operiert. (Die zwei restlichen in "Material und Methode" beschriebenen Tiere einer jeden Gruppe wurden nicht ausgewertet).

x: TdR-³H-MI (%) für jeweils eine Insel.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

(Z): Zahl der für ein Tier ausgewerteten Zellen.
(Diese Zahl variiert entsprechend Größe und Zahl der gefundenen Inseln).

gesamte Insel		zentraler Inselbereich		peripherer Inselbereich	
x	(Z)	x	(Z)	x	(Z)
26,0	(218)	2,0	(51)	5,9	(54)
4,4	(94)	13,8	(91)	7,2	(74)
18,9	(201)	15,2	(91)	4,2	(74)
17,2	(232)	9,2	(83)	4,6	(68)
10,1	(164)	15,7	(81)	4,8	(66)
19,8	(115)	8,1	(40)	4,8	(87)
5,3	(60)				
5,1	(62)				
$\bar{x}$	15,64	11,5		5,2	

Tabelle 12: Versuch einer differenzierteren Auswertung verschiedener Inselbereiche bei einem Tier, welches 76 Tage DÄNA erhalten hatte und nach weiteren 16 Tagen getötet wurde.

x, $\bar{x}$ und (Z): Siehe Legende der Tabelle 11.

Parenchym mit erh. Enz.akt.		große Inseln			kleine Inseln		
x	(Z)	x	(Z)	RE	x	(Z)	RE
11,9	(433)	22,6	(997)	9x9	16,8	(125)	3x4
10,1	(406)	23,4	(997)	10x10	19,0	(211)	3x3
9,2	(327)	17,7	(753)	9x8	17,1	(275)	3x2
7,2	(307)	29,8	(986)	8x8	23,6	(136)	2x2
13,5	(311)	17,1	(749)	9x9	10,7	(289)	2x2
10,6	(331)				29,7	(155)	2x1
6,4	(375)				15,7	(153)	3x2
					24,5	(195)	2x2
					12,2	(246)	2x2
$\bar{x}$	9,8	22,1			18,8		

Tabelle 13: Versuch einer getrennten Auswertung für Parenchym mit erhaltener Enzymaktivität, große Inseln (ab 8x8 Rastereinheiten) und kleine Inseln (bis 4x4 Rastereinheiten) bei einem Tier, welches 90 Tage DÄNA erhalten hatte.

x, $\bar{x}$ und (Z): Siehe Legende der Tabelle 11.

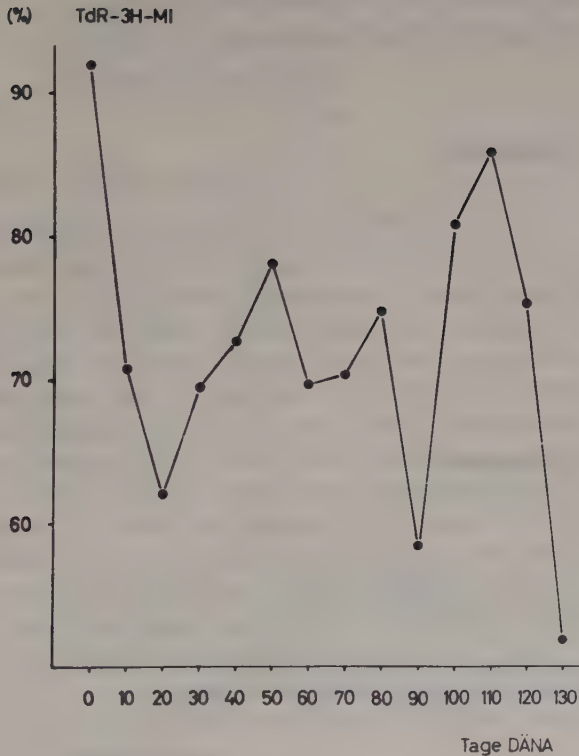


Abb. 36: TdR-³H-MI (%) im Gesamtparenchym der nach einer 2/3-Hepatektomie regenerierenden Leber nach 7-maliger TdR-³H-Markierung mit einem Intervall von jeweils 6 Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten der DANA-Carcinogenese.

Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DANA/kg/Tag.
Ordinate: TdR-³H-MI (%). Für jedes Tier wurde der Mittelwert angegeben. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (Siehe auch Tab. 10).

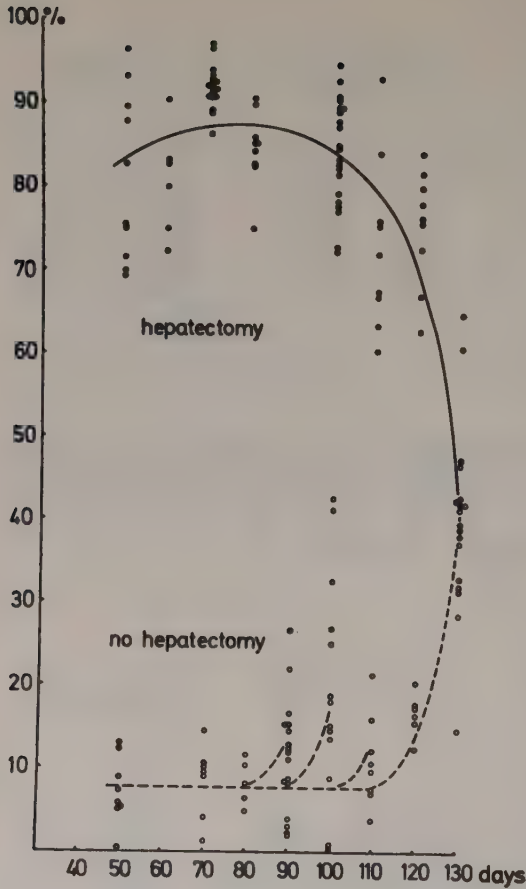


Abb. 37: TdR-³H-MI (%) in den ATPase-defizienten Inseln der ruhenden Leber (untere Kurve) und der nach einer 2/3-Hepatektomie regenerierenden Leber (obere Kurve) nach 7-maliger TdR-³H-Markierung mit einem Intervall von jeweils 6 Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese.

A
Abszisse: Dauer kontinuierlicher Gabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag.
Ordinate: TdR-³H-MI (%). Für jede ausgewertete Insel wurde der Mittelwert eingetragen. (Siehe auch Tab. 11).

IV. EINFLUSS MEHRERER TEILHEPATEKTOMIEN AUF DIE
ÜBERLEBENSZEIT DÄNA-GEFÜTTERTER RATTEN UND
AUF DIE WACHSTUMSKINETIK DER BEZIRKE MIT
HISTOCHEMISCHEM VERLUST DER ADENOSIN-TRI-
PHOSPHATASE-AKTIVITÄT.

1. Literaturübersicht.

1.1. Regenerationskapazität der Leber.

Die Leber besitzt eine außerordentlich große Regenerationskapazität. Durch mehrere aufeinanderfolgende Teilhepatektomien kann sie über einen längeren Zeitraum hinweg zur Regeneration stimuliert werden. Fünf aufeinanderfolgende Teilhepatektomien mit Entfernung bis zu 96 % des ursprünglichen Leberparenchyms führen zu einer fast vollständigen Restauration (Simpson und Finckh 1963). Die Regenerationskapazität bleibt der Leber auch nach 12 Teilhepatektomien, welche in einmonatigen Abständen durchgeführt werden, erhalten (Ingle und Baker 1957). Die menschliche Leber kann nach Resektion des rechten Lappens (major hepatectomy), was einer Entfernung von 75-80% Leberparenchym entspricht, pro Tag um mehr als 50 g an Gewicht zunehmen (Pack et al. 1962).

1.2. Zeitlicher Ablauf der Regeneration nach einer
2/3-Hepatektomie.

Einer 2/3-Resektion der Rattenleber schließt sich eine etwa drei Tage dauernde rapide Wachstumsphase an, danach nimmt die Proliferationsaktivität der Hepatocyten wieder ab (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Der größte Teil des Zelldefizits wird in den ersten drei Tagen ersetzt (Fabrikant 1968). Nach 10-18 Tagen hat die Leber wieder ihre ursprüngliche Masse erhalten (Harkness 1957, Weinbren 1959, Pack et

al. 1962). Die relative Häufigkeit der S-Phasen-Zellen kehrt 2-3 Wochen nach der Operation wieder zum Normalwert zurück (Fabrikant 1968). Die ursprüngliche Zahl der Leberzellkerne wird nicht mehr ganz erreicht, dafür sind höhere Ploidiestufen in stärkerem Maße als zuvor vertreten (Bucher 1963).

1.3. Unterschwellige und überschwellige Leberregeneration.

Zur Auslösung einer eigentlichen Regeneration müssen mindestens etwa 30 % Lebergewebe (Schwellenwert) entfernt werden (Edwards et al. 1959): Reseziert man zwischen 10 und 30 % Lebergewebe, dann steigt der Mitose-Index in der Regenerationsphase nur auf das 5-fache, während er nach 68-prozentiger Resektion auf das 400-fache steigt (Glinos 1958). Eine unterschwellige Resektion hat demnach eine unterschwellige Regeneration zur Folge. Stöcker (1966) sowie Heine und Stöcker (1968) zeigten, daß 24-26 Stunden nach einer Resektion von etwa 30 % Lebergewebe eine eindeutig beschleunigte DNS-Syntheserate und klare Hinweise für einen schnellen Proliferationsmodus vorliegen.

Es wäre denkbar, daß eine Regeneration nach mehreren aufeinandergefolgten Teilhepatektomien anderen Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist. Bei zweimaliger 1/3-Hepatektomie mit einem Intervall von 3 Monaten konnten keine klaren Aussagen über die DNS-Synthese nach der zweiten Operation getroffen werden (Heine und Stöcker 1968): Bei einigen Tieren war der Anteil an S-Phasen-Zellen nach der zweiten Operation ebenso groß wie nach der ersten Operation, bei anderen Tieren wurden höhere Werte gefunden. Die höheren Werte werden von den Autoren damit erklärt, daß bei der zweiten, nicht mehr so gut standardisierbaren Operation nur annähernd adäquate Mengen reseziert wurden. Die genannten Autoren führten nach demselben Schema auch zwei 2/3-Hepatektomien durch. Nach der ersten Operation wurde dabei ein TdR-³H-MI von 30 %, nach der zweiten Operation ein TdR-³H-MI von 10 % gefunden. Vielleicht ist diese Abnahme des TdR-³H-MI nach der zweiten Operation nur Ausdruck einer verzögert anlaufenden DNS-Synthesewelle.

1.4. Zur Überlebenszeit und dem Verhalten der Inseln nach einer 2/3-Hepatektomie während der DÄNA-Carcinogenese.

Eine während der Hepatocarcinogenese gesetzte Teilhepatektomie bleibt offenbar ohne Einfluß auf die Überlebenszeit der Ratten: Nach 83-tägiger Dauergabe von 5 mg DÄNA/kg/Tag finden sich gleich lange Überlebenszeiten für Tiere, die einen Tag nach Absetzen des DÄNA 2/3-hepatektomiert wurden, und für Tiere, die nicht operiert wurden (Rajewsky et al. 1966).

In anderen Untersuchungen wurde das Verhalten der Inseln in Abhängigkeit von einer 2/3-Hepatektomie geprüft (Hoffmann 1970): Nach 6-wöchiger Gabe von 6 mg DÄNA/kg/Tag und weiteren 6 Wochen Versuchszeit ohne DÄNA entwickelten die Tiere, die zu Versuchsbeginn oder eine Woche später 2/3-hepatektomiert worden waren, um über die Hälfte mehr G-6-Pase-Inseln als die Tiere, die nicht operiert worden waren. Eine Operation in der dritten oder vierten Versuchswoche hatte nur noch einen geringen bzw. keinen Effekt auf die Entstehung der Inseln. Dies zeigt, daß die Wirkung nicht nur von der Art, sondern auch vom Zeitpunkt der Wachstumsanregung abhängt.

Im Versuchsteil III wurde gezeigt, wie das Inselwachstum - sieht man von den späten Stadien mit autonomem Wachstum ab - von höheren Regulationsmechanismen abhängig ist. Dementsprechend müßte man nach mehreren aufeinanderfolgenden Teilhepatektomien ein beschleunigtes Inselwachstum erwarten.

2. Zur Versuchsplanung.

In diesem Versuchsteil soll anhand der Überlebenszeit der Tiere sowie der Wachstumskinetik der ATPase-defizienten Inseln geprüft werden, ob mehrere aufeinanderfolgende Teilhepatektomien die Carcinogenese im Sinne eines Promotionsfaktors beeinflussen. Anzahl und Zeitpunkt der Operationen

sollen variiert werden. Zwischen den einzelnen Resektionen liegt stets ein Intervall von einer Woche, in deren erster Hälfte die Tiere kein DÄNA erhalten. Dadurch wird die Leber während der etwa drei Tage anhaltenden rapiden Wachstumsphase geschont. Dies ist von Wichtigkeit, da nicht der Einfluß von DÄNA auf die regenerierende Leber geprüft werden soll, vielmehr der Einfluß einer Regeneration auf die Carcinogenese.

3. Material und Methode.

3.1. 44 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 150-170 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Die DÄNA-Gabe erfolgte bis zum Tode der Tiere mit jeweils 3-tägigen, am 8., 15., 22., 29. und 36. Versuchstag beginnenden Unterbrechungen. Die Tiere wurden nach folgendem Plan operiert:

Gruppe	Tierzahl	Operationstage (Tage nach Versuchsbeginn)
0	7	nicht operiert (Kontrollgruppe)
I	8	8.
II	7	8., 15.
III	8	8., 15., 22.
IV	7	8., 15., 22., 29.
V	7	8., 15., 22., 29., 36.

Operations-tag	entfernter Leberlappen	Anteil des resezierten Gewebes an dem zum Zeitpunkt der Op. vorhandenen Lebergewebe
8.	Lobus sinister medialis	14,65 $\pm$ 1,70 %
15.	Lobus dexter medialis	17,92 $\pm$ 4,29 %
22.	Lobus sinister lateralis	32,22 $\pm$ 6,54 %
29.	Lobus dexter lateralis	17,76 $\pm$ 4,12 %
36.	Processus caudatus des Lobus dexter lateralis	41,84 $\pm$ 14,10 %

Bestimmt wurde die Überlebenszeit, vom ersten Fütterungstag an gerechnet.

3.2. 47 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 230-300 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Die DÄNA-Gabe erfolgte bis zum Tode der Tiere mit jeweils 3-tägigen, am 8., 16. und 24. Versuchstag beginnenden Unterbrechungen. Die Tiere wurden nach folgendem Plan operiert:

Gruppe	Tierzahl	Operationstage (Tage nach Versuchsbeginn)
0	10	nicht operiert (Kontrollgruppe)
I	19	8.
II	12	8., 16.
III	6	8., 16., 24.

Operations-tag	entfernte Leberlappen	Anteil des resezierten Gewebes an dem zum Zeitpunkt der Op. vorhandenen Lebergewebe
8.	Lobus sinister medialis + Lobus dexter medialis + Lobus sinister lateralis (Higgins u. Anderson 1931)	67 % *
16.	Lobus dexter lateralis	$36,63 \pm 3,17$ %
24.	Processus caudatus des Lobus dexter lateralis	$28,13 \pm 5,62$ %

* Die 2/3-Hepatektomie nach Higgins und Anderson (1931) stellt mit Sicherheit einen überschwelligen Regenerationsreiz dar. Daher wurde auf eine genaue Bestimmung dieses Wertes verzichtet.

Bestimmt wurde die Überlebenszeit, vom ersten Fütterungstag an gerechnet.

3.3. 29 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 230-300 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Die DÄNA-Gabe erfolgte bis zum Tode der Tiere mit jeweils 3-tägigen, am 35., 43. und 51. Tag beginnenden Unterbrechungen. Die Tiere wurden nach folgendem Plan operiert:

Gruppe	Tierzahl	Operationstage (Tage nach Versuchsbeginn)
0	9	nicht operiert (Kontrollgruppe)
I	11	35.
II	7	35., 43.
III	2	35., 43., 51.

Die Resektionen entsprachen denen im Abschnitt 3.2.:

35. Tag: 2/3-Hepatektomie nach Higgins und Anderson.

43. Tag: Lobus dexter lateralis.

51. Tag: Processus caudatus des Lobus dexter lateralis.

Bestimmt wurde die Überlebenszeit, vom ersten Fütterungstag an gerechnet.

3.4. 18 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 150-170 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Die DÄNA-Gabe erfolgte bis zum Tode der Tiere mit jeweils 3-tägigen, am 8., 15., 22., 29. und 36. Tag beginnenden Unterbrechungen. Die Tiere wurden nach folgendem Plan operiert:

Gruppe	Tierzahl	Operationstage (Tage nach Versuchsbeginn)
0	3	nicht operiert (Kontrollgruppe)
I	3	8.
II	4	8., 15.
III	3	8., 15., 22.
IV	3	8., 15., 22., 29.
V	2	8., 15., 22., 29., 36.

Die 5 Resektionen entsprechen den in Abschnitt 3.1 beschriebenen.

Alle Tiere wurden am 70. Versuchstag durch Nackenschlag getötet. Nach sofortiger Entnahme wurde der Processus papillaris mit flüssigem CO₂ eingefroren. Der Processus papillaris, ein kleiner Leberlappen, welcher sich um die Curvatura minor des Magens legt, war bei den 5-fach operierten Tieren das einzige noch vorhandene Lebergewebe. Von jedem Tier wurden 6 Serien-Kryostatschnitte, davon je 3 ATPase- und 3 G-6-Pase-Präparate angefertigt. Die histochemische Aufarbeitung erfolgte nach dem in Versuchsteil II (Seite 55-56) beschriebenen Schema.

Mikroskopische Auswertung: An den ATPase-Schnitten wurde bestimmt

1. Zahl der Inseln je cm²
2. Flächenhafter Anteil der Inseln am Gesamtparenchym
3. Relative Klassenhäufigkeit der einzelnen Größenklassen.

(Siehe auch methodischer Abschnitt im Versuchsteil II).

3.5. 10 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 190 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Geprüft werden sollte die Massenzunahme der Leber zwischen den 5 Operationen, die in den Abschnitten 3.1 und 3.4 beschrieben wurden. Hierzu wurden 8 Tage nach den einzelnen Operationen je 2 Tiere getötet. Nach Entnahme der Leber bzw. des noch vorhandenen Leberrestes wurden Frisch- und Trockengewicht bestimmt.

3.6. Es sollte hier geprüft werden, ob die zweite Teilhepatektomie in den Abschnitten 3.1 und 3.4 einen überschweligen Proliferationsreiz darstellt.

5 männliche Ratten (Wistar AF/Han) mit einem Anfangsgewicht von 150-170 g erhielten Altromin-Standarddiät und im Trinkwasser 5 mg DÄNA/kg/Tag. Die DÄNA-Gabe erfolgte vom 0.-8. und vom 11.-15. Versuchstag. 3 Tiere wurden am 8. und 15.

Versuchstag nach dem in Abschnitt 3.1 angegebenen Schema operiert. 20 Stunden nach der 2. Operation begann für alle Tiere die radioaktive Versuchszeit mit 7 aufeinanderfolgenden TdR-³H-Injektionen (Siehe Versuchsteil III, Seite 84). Danach wurden Autoradiogramme hergestellt. Schließlich wurde für jedes Tier nach meanderförmiger Einzellauszahlung von 10000 Hepatocyten der TdR-³H-MI bestimmt.

4. Ergebnisse.

4.1. Überlebenszeit der in einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0- bis 5-fach teilhepatektomierten Tiere.

Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen 5 Teilhepatektomien bleiben ohne Einfluß auf die Überlebenszeit der Tiere. Für die 0- bis 5-fach operierten Tiere wurden mittlere Überlebenszeiten von 161.7, 166.3, 153.4, 151.3, 154.3 bzw. 156.4 Tagen gefunden (Tab. 15, Abb. 38).

4.2. Überlebenszeit der in einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0- bis 3-fach teilhepatektomierten Tiere.

Eine größere Resektion im Anfangsstadium der DÄNA-Carcinogenese scheint die Überlebenszeit der Tiere zu verkürzen. Bei dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen Versuch scheint die am 8. Tag gesetzte 2/3-Hepatektomie hierfür entscheidend zu sein. Die zwei weiteren Teilhepatektomien führen zu keiner zusätzlichen Verkürzung der Überlebenszeit. Für die 0- bis 3-fach operierten Tiere wurden mittlere Überlebenszeiten von 139.9, 117.9, 118.0 bzw. 123.5 Tagen gefunden (Tab. 16 und Abb. 39).

4.3. Überlebenszeit der in einem späten Stadium der DÄNA-Carcinogenese 0- bis 3-fach teilhepatektomierten Tiere.

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Teilhepatektomien führten zu keiner Verkürzung der Überlebenszeit. Für die 0- bis 3-fach operierten Tiere wurden mittlere Überlebenszeiten von 140.4, 135.2, 131.9 bzw. 119.0 Tagen gefunden (Tab. 16 und Abb. 39). Bei einer Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch die Gruppe 3 nicht mit berücksichtigt werden, da sie nur aus 2 Tieren besteht.

4.4. Wachstumskinetik der ATPase-defizienten Inseln nach bis zu fünf, während einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese gesetzten Teilhepatektomien.

Die 0- bis 2-fach operierten Tiere (siehe Abschnitt 3.4) zeigen am 70. Versuchstag eine nahezu identische Wachstumskinetik der ATPase-defizienten Inseln. Demgegenüber ist bei den 3- und 4-fach operierten Tieren das Inselwachstum am 70. Tag schon wesentlich weiter fortgeschritten. Zwischen 3- und 4-fach operierten Tieren sind keine Unterschiede festzustellen. Die 5-fach operierten Tiere gleichen in der Wachstumskinetik der Inseln am 70. Versuchstag den 0- bis 2-fach operierten Tieren.

Demnach wurde das Inselwachstum durch die 3. Teilhepatektomie beschleunigt. Die Teilhepatektomien 1, 2 und 4 blieben ohne Einfluß auf das Inselwachstum. Der Einfluß der 5. Operation bleibt unklar.

Bei den 0- bis 2-fach operierten Tieren gehören die größten Inseln der 6., 7. bzw. 7. Größenklasse an (Tab. 17 und Abb. 40). In diesen Gruppen kam es noch zu keiner Konfluktion der Inseln (Abb. 42). Der flächenhafte Anteil der Inseln am Gesamtparenchym beträgt für diese Gruppen 0.66, 1.57 bzw. 1.53 % (Abb. 43).

Bei den 3- und 4-fach operierten Tieren gehören die größten Inseln der 15. bzw. 14. Größenklasse an (Tab. 17 und Abb. 41-42; in Abb. 41 sind 14. und 15. Größenklasse der Gruppe IV falsch eingezeichnet). In diesen Gruppen deutet sich bereits eine beginnende Konfluktion an (Abb. 42). Der flächenhafte Anteil am Gesamtparenchym beträgt 3,56 bzw. 4,32 % (Abb. 43).

Die Ergebnisse der 5-fach operierten Tiere gleichen denen der 0- bis 2-fach operierten Tiere.

Die Bestimmung der Inselzahl je Flächeneinheit führte zu keinen klaren Ergebnissen (Abb. 44).

4.5. Gewichtszunahme der Rattenleber nach bis zu fünf aufeinanderfolgenden Teilhepatektomien.

Zwischen den 5 Teilhepatektomien des Abschnittes 3.5 erreicht die Leber stets wieder ihre ursprüngliche Masse (Tab. 18). Wie in dem folgenden Diskussionsteil erläutert wird, ist der Grund dafür meist nicht in einer echten Regeneration, vielmehr in einer Hypertrophie, einem Oedem und einer Vaskularisierung zu suchen.

4.6. Der TdR-³H-MI nach einem unterschwelligen Proliferationsreiz und mehrfacher Pulsmarkierung.

Die 2. Teilhepatektomie der Abschnitte 3.1 und 3.4 stellt einen unterschwelligen Proliferationsreiz dar; Die beiden nicht operierten Tiere des Abschnittes 3.6 zeigen einen TdR-³H-MI von 4.5 und 2.0 %, die drei 2-fach operierten Tiere dieses Abschnittes zeigen einen TdR-³H-MI von 11.4, 48.1 und 19.8 % (Tab. 19). Nach einem überschwelligen Proliferationsreiz und der mehrmaligen Pulsmarkierung müßte der TdR-³H-MI bei Tieren, die kurzfristig DÄNA erhalten haben, Werte zwischen 60 und 80 % annehmen (Siehe Tab. 10, Seite 93).

Zusatzbefund: In den Autoradiogrammen der drei operierten Tiere (mehrmalige Markierung während unterschwelliger Regeneration) lagen auffallend häufig zwei Zellen mit markierten Kernen direkt nebeneinander (Bild 9). Dieser Befund soll Gegenstand einer weiteren Überlegung im folgenden Diskussionsteil sein.

5. Diskussion.

5.1. Ausmaß der Wachstumsanregung nach den verschiedenen Teilhepatektomien.

Bei den 0- bis 5-fach teilhepatektomierten Tieren stellen die Operationen 1, 2 und 4 einen unterschwelligen, die Operationen 3 und 5 einen überschwelligen Proliferationsreiz dar.

Bei den 0- bis 3-fach teilhepatektomierten Tieren wirken die Operationen 1 und 2 als überschwellige Proliferationsreize. Das Ausmaß der 3. Resektion entspricht im Mittel gerade dem Schwellenwert. Man muß daher nach der 3. Operation bei einem Teil der Tiere mit einer unterschwelligen Regeneration, bei einem anderen Teil der Tiere mit einer überschwelligen Regeneration rechnen.

Bei den 0- bis 5-fach operierten Tieren hätte man nach der 2. Teilhepatektomie ebenso eine überschwellige Regeneration erwarten können: Zwar wurden hierbei nur 17,9 % des Lebergewebes reseziert, dieser Operation ist aber eine unterschwellige Resektion (14,7 %) vorausgegangen. Ein Summationseffekt beider Operationen trat jedoch nicht ein.

5.2. Die Überlebenszeit bestimmende Faktoren.

Die Überlebenszeit scheint ein sehr grober Parameter für den Ausbildungsgrad des Tumors zu sein. Die Todesursache ist für die meisten Tiere auch nicht das Erreichen eines bestimmten Tumorstadiums, vielmehr eine Leberblutung mit hämorrhagischem Ascites. Dennoch sprechen die Ergebnisse

dafür, daß eine größere Resektion während des toxischen Initialstadiums, nicht aber in späteren Stadien, die Überlebenszeit verkürzt. Ein solches Ergebnis stünde in Einklang mit den Befunden von Hoffmann (1970, siehe S. 101).

Beim Vergleich der einzelnen Ergebnisse fällt auf, daß die unbehandelten Kontrollen der 5-fach operierten Tiere den DÄNA-Fütterungsbeginn um 162 Tage, die Kontrollen der 3-fach operierten Tiere diesen nur um 140 Tage überlebten. Als Erklärung für diese Diskrepanz bieten sich das unterschiedliche Alter der Tiere zu Beginn der Fütterung sowie der unterschiedliche Modus der DÄNA-Dauertränkung an.

5.3. Wachstumskinetik der Inseln in Abhängigkeit von der Stärke des Regenerationsreizes.

Die Wachstumskinetik der Inseln ist demgegenüber offenbar ein empfindlicher Parameter für die Dynamik der Carcinogenese. Die unterschwelligen Resektionen konnten das Inselwachstum nicht beschleunigen. Die 0- bis 2-fach operierten Tiere (siehe Abschnitte 3.4 und 4.4) zeigen Inseln, wie sie normalerweise am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese auftreten. Dies geht aus einem Vergleich der Abbildungen 22 und 30 mit den Abbildungen 40 und 42 hervor. Die 3- und 4-fach operierten Tiere zeigen hingegen Inseln, wie sie normalerweise erst zwischen 80. und 90. Fütterungstag auftreten (Abb. 23, 24, 31, 32, 41 und 42). Unklar bleibt, welche Bedeutung der 5. Teilhepatektomie als Promotionsfaktor der Carcinogenese zukommt. Man darf annehmen, daß die hier gewonnenen Ergebnisse auf Grund der kleinen Tierzahl (nur 2 Tiere) falsche Verhältnisse vortäuschen.

Die 5. Teilhepatektomie müßte ihrem Umfang nach einen überschwelligem Proliferationsreiz darstellen. Sie fällt auch in ein Stadium, in dem sich die Inseln im Gegensatz zu ihrer Umgebung durch eine hohe induzierbare Proliferationsaktivität auszeichnen. Man müßte gerade nach dieser Operation ein beschleunigtes Inselwachstum fordern.

Dennoch gibt es eine Erklärungsmöglichkeit für ein verlangsamtes Inselwachstum nach der 5. Teilhepatektomie: Diese Operation könnte für den Organismus eine so starke Belastung darstellen, daß hierdurch die Proliferationsaktivität stark abgeschwächt wird. Die Untersuchungen von Heine und Stöcker (1968; siehe S. 100) weisen in diese Richtung. Folgen wären entweder eine reversible Hemmung des Inselwachstums mit einem zu späteren Zeitpunkten beschleunigten Inselwachstum oder aber ein ständig bleibender Rückstand des Inselwachstums.

5.4. Überlegung zur Bestimmung der Zellcyclus-Phasen nach einem unterschwelligen Proliferationsreiz und "Dauermarkierungen" unterschiedlicher Länge.

Nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung während einer unterschwelligen Regeneration findet man häufig zwei markierte Hepatocyten direkt nebeneinander (Siehe Abschnitt 4.6 und Bild 9). Da es sich nicht um zweikernige Hepatocyten handelt, muß man annehmen, daß solche markierte Zellpaare nach Einwirken des unterschwelligen Proliferationsreizes durch Zellteilung entstanden sind. Nach einem überschwelligen Proliferationsreiz und anschließender Dauermarkierung sind diese während der radioaktiven Versuchszeit entstandenen Tochterzellen nicht mehr erkennbar, da es dann zu einer Markierung nahezu aller Hepatocyten kommt.

Mit einem unterschwelligen Proliferationsreiz und daran anschließenden Dauermarkierungen unterschiedlicher Länge könnte man auf einfache Weise die Dauer der einzelnen Cyclusphasen bestimmen: Bei kurzer radioaktiver Versuchszeit würde man keine Paare markierter Hepatocyten finden. Nach der Zeitspanne $G_2 + M$ müßten die ersten Paare markierter Hepatocyten erscheinen. Deren Häufigkeit müßte über einen Anstieg ein Plateau erreichen. Die Länge des Anstiegs entspräche t_S . Dem Plateau müßte nach einem Intervall von der Länge t_C ein zweiter Anstieg folgen u.s.w. Eine mögliche Fehlerquelle wären jedoch wieder toxische TdR-³H-Effekte.

Gruppe	1. OP	2. OP	3. OP	4. OP	5. OP
V	0,34 0,32 0,32 0,28 0,29 0,30 0,29	0,31 0,31 0,51 0,26 0,52 0,57 0,50	1,19 0,53 0,71 0,58 0,91 1,10 0,84	0,27 0,39 0,38 0,51 0,56 0,66 0,49	0,84 1,19 1,08 0,71 1,48 1,34 0,79
IV	0,32 0,34 0,32 0,31 0,32 0,38 0,31	0,49 0,54 0,66 0,57 0,65 0,62 0,57	0,93 0,72 1,10 0,95 1,08 0,93 0,92	0,43 0,67 0,43 0,37 0,42 0,45 0,39	
III	0,27 0,29 0,29 0,32 0,39 0,38 0,37 0,30	0,55 0,59 0,53 0,75 0,73 0,69 0,67 0,63	0,89 0,84 0,77 1,20 0,85 0,98 0,98 0,85		
II	0,36 0,30 0,34 0,37 0,33 0,35 0,37	0,50 0,53 0,66 0,82 0,80 0,77 0,66			
I	0,36 0,45 0,40 0,39 0,39 0,40 0,34 0,37				

Tab. 14: Trockengewichte (g) der resezierten Leberlappen
(Operationsplan siehe Abschnitt 3.1, Seite 102).

Tier	Gruppe					
	0	I	II	III	IV	V
1	163	158	162	131	104	141
2	169	155	152	141	149	152
3	183	161	151	150	158	154
4	169	172	152	153	161	154
5	149	174	155	158	162	161
6	154	172	159	158	163	162
7	145	173	143	158	183	171
8		165		161		
$\bar{x}$	161,7	166,3	153,4	151,3	154,3	156,4
s	13,3	7,5	6,6	9,9	24,4	9,5

Tab. 15: Überlebenszeit (Tage) der in einem frühen Stadium
der DÄNA-Carcinogenese 0- bis 5-fach teilhepatek-
tomierten Tiere (Operationsplan siehe Abschnitt
3.1, Seite 102).

$\bar{x}$ = Mittelwert einer Gruppe s = Standardabweichung.

	5	4	3	2	1
0	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5
1	0,05	0,3	0,005	0,005	
2	0,6	0,95	0,7		
3	0,4	0,8			
4	0,9				

Fortsetzung der Tab. 15: Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen zweier Stichproben. Die Berechnung erfolgte nach dem Student-t-Test (Siehe auch Seite 26).

Tier	Gruppe							
	0	1	2	3	0	1	2	3
	(1. OP am 8. Tag)				(1. OP am 35. Tag)			
1	136	118	105	100	128	130	133	124
2	148	124	128	121	147	125	149	114
3	142	112	110	126	149	135	149	
4	142	127	119	125	138	139	100	
5	142	106	119	127	145	130	128	
6	154	106	119	142	145	125	134	
7	133	139	112		149	131	130	
8	138	124	127		133	139		
9	130	119	111		130	145		
10	134	111	126			155		
11		111	118			133		
12		112	126					
13		96						
14		104						
15		131						
16		119						
17		120						
18		125						
19		136						
$\bar{x}$	139,9	117,9	118,0	123,5	140,4	135,2	131,9	119,0
s	7,3	11,3	7,6	13,6	8,4	9,0	16,5	(7,1)

	3	2	1		3	2	1
0	0,01	0,001	0,001	0	(0,01)	0,2	0,3
1	0,4	0,98		1	(0,05)	0,6	
2	0,3			2	(0,4)		

Tabelle 16 (Legende siehe Seite 114).

Größen- klassen	Gruppe					
	0	1	2	3	4	5
1	72,39	66,19	63,51	32,33	43,86	60,52
2	19,88	18,87	21,48	20,94	22,74	22,49
3	6,08	8,93	11,88	19,95	12,17	10,12
4	1,54	2,56	1,79	8,44	5,56	5,98
5	0,51	1,43	0,72	4,60	3,85	-
6	0,26	1,04	0,42	3,67	3,31	0,88
7		0,47	0,14	2,54	1,60	-
8				1,37	1,35	-
9				1,18	1,20	-
10				1,04	0,41	-
11				1,04	0,41	-
12				-	0,94	-
13				0,37	0,26	-
14				-	0,74	0,58
15				0,64		

Tab. 17: Relative Häufigkeit (%) einzelner Größenklassen ATPase-defizienter Inseln am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese nach bis zu fünf, in einem frühen Cancerisierungsstadium gesetzten Teilhepatektomien. (Operationsplan siehe Abschnitt 3.4, Seite 104).

Die Größenklassen 1, 2, 3, ..., 15 entsprechen Inseln mit einer Größe von 0.0-0.5, 0.5-1.0, 1.0-1.5, ..., 7.0-7.5 planimetrischen Flächeneinheiten. Eine planimetrische Flächeneinheit entspricht einer Fläche von 0,1168 mm².

Tab. 16 (Seite 113): Überlebenszeit 0- bis 3-fach teilhepatektomierter Tiere. Die Tiere der linken Tabellenhälfte wurden in einem frühen Stadium der DÄNA-Carcinogenese operiert (Operationsplan siehe Abschnitt 3.2, Seite 103), die Tiere der rechten Tabellenhälfte wurden in einem späteren Stadium operiert (Operationsplan siehe Abschnitt 3.3, Seite 104).

$\bar{x}$ = Mittelwert einer Gruppe s = Standardabweichung.

Im unteren Teil der Tabelle ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für die Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen zweier Stichproben angegeben. Die Berechnung erfolgte nach dem Student-t-Test (Siehe auch Seite 26). Bei Gruppe 3 der rechten Tabellenhälfte sind die Werte wegen der kleinen Tierzahl in Klammern angegeben.

	Frish- gewicht	Trocken- gewicht
Vor der 1. OP	7,72 8,25	2,23 2,44
8 Tage nach der 1. OP	8,75 8,97	3,12 3,37
8 Tage nach der 2. OP	10,56 10,07	2,82 2,67
8 Tage nach der 3. OP	8,85 7,46	2,65 2,45
8 Tage nach der 4. OP	8,85 8,47	2,49 2,34

Tab. 18: Massenzunahme der Restleber zwischen den 5 Teilhepatektomien (Siehe Abschnitt 3.5, Seite 105). Angegeben sind die Frisch- und Trockengewichte der Leber (g) für jeweils 2 Tiere.

Ohne Operation		nach 2 Teilhepatektomien		
Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
4	7	17	20	20
10	2	19	45	15
0	1	4	28	14
3	0	11	33	24
6	2	8	14	21
9	1	9	48	19
3	2	4	36	21
2	0	9	114	19
5	3	19	71	23
3	2	14	72	21
$\bar{x}$: 4,5	2,0	11,4	48,1	19,8

Tab. 19: TdR-³H-MI (°/oo) in der ruhenden Leber (Tiere 1 und 2) und in der nach einem unterschwelligen Proliferationsreiz partiell regenerierenden Leber (Tiere 3, 4 und 5) nach 7-facher TdR-³H-Markierung mit 6-stündigem Intervall zwischen den einzelnen Injektionen. Für jedes Tier wurden 10 x 1000 Hepatocyten ausgewertet.
(Operationsplan siehe Abschnitt 3.6, Seite 105-106).

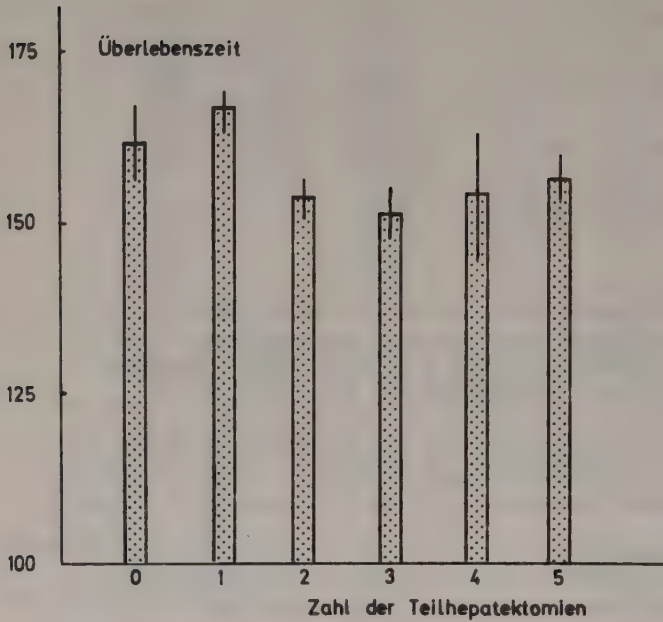


Abb. 38: Überlebenszeit der in einem frühen Stadium der DANA-Carcinogenese 0- bis 5-fach teilhepatektomierten Tiere (Operationsplan siehe Abschnitt 3.1, Seite 102).

Abszisse: Zahl der bei einem Tier durchgeführten Teilhepatektomien.

Ordinate: Mittlere Überlebenszeit (Tage seit Versuchsbeginn) einer Gruppe mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 15, Seite 112).

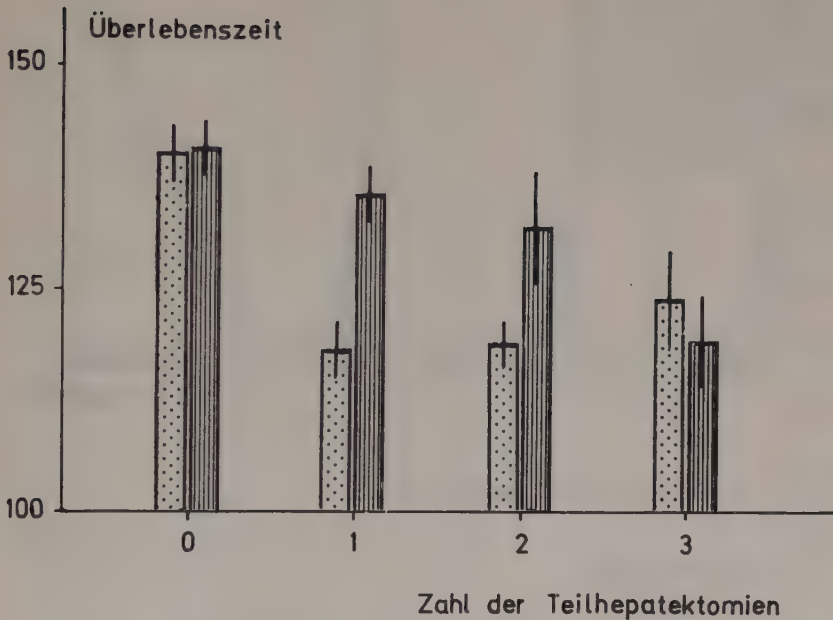


Abb. 39: Überlebenszeit der in einem frühen Stadium (helle Säulen) und in einem späten Stadium (dunkle Säulen) der DÄNA-Carcinogenese 0- bis 3-fach teilhepatektomierten Tiere (Operationspläne siehe Abschnitt 3.2, Seite 103 und Abschnitt 3.3, Seite 104).

Abszisse: Zahl der bei einem Tier durchgeführten Teilhepatektomien.

Ordinate: Mittlere Überlebenszeit (Tage seit Versuchsbeginn) einer Gruppe mit mittlerem Fehler des Mittelwertes (Siehe auch Tab. 16, Seite 113).

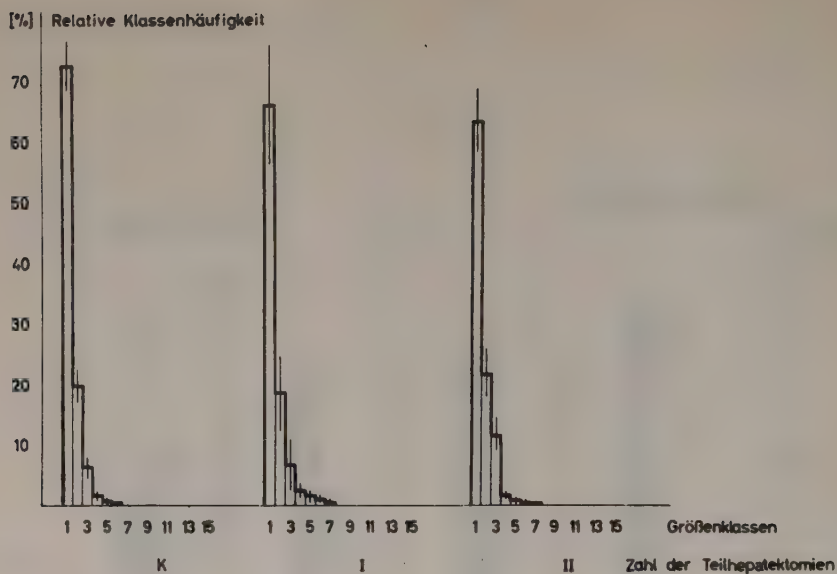


Abb. 40 (Legende siehe Seite 119).

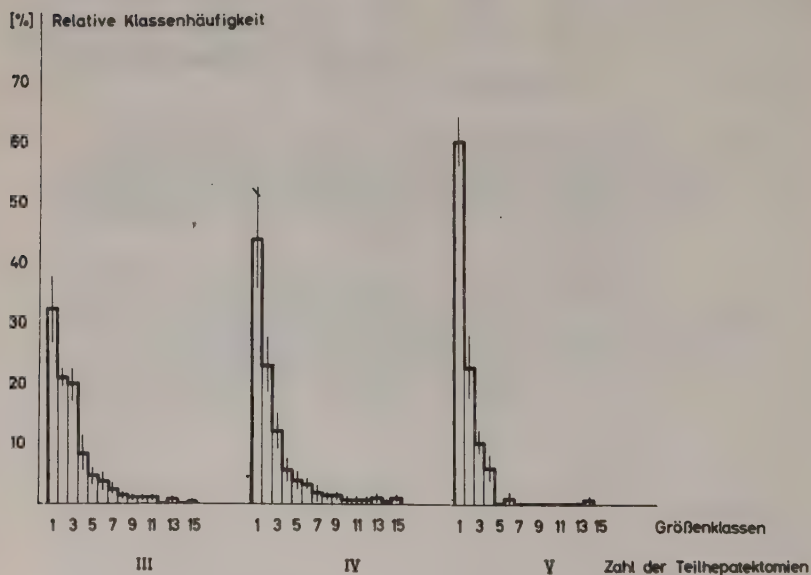
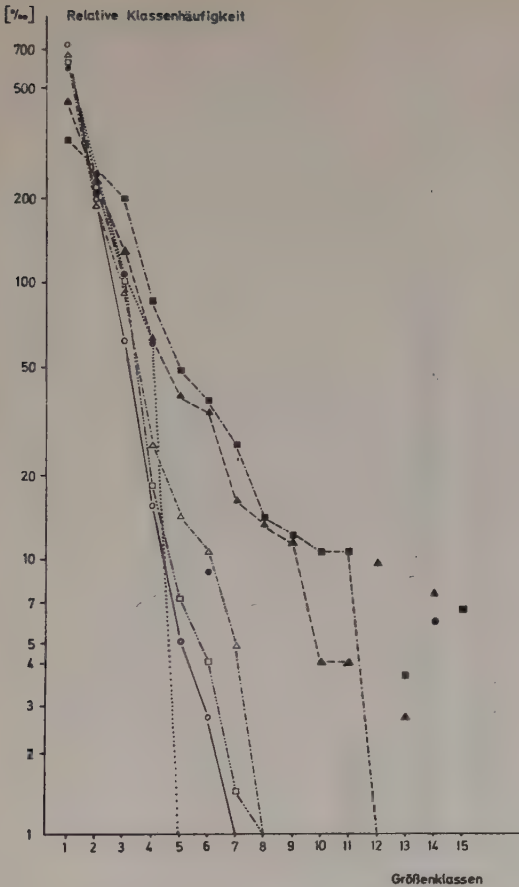


Abb. 41 (Legende siehe Seite 119).



Tab. 42: Häufigkeitsverteilung der ATPase-defizienten Inseln entsprechend einzelner Größenklassen am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese bei Tieren, die in einem frühen Cancerisierungsstadium 0- bis 5-fach teilhepatektomiert wurden. Die hier gewählte Form der Darstellung wurde bereits auf Seite 79 für die Abb. 28-35 erklärt.

- Ohne Teilhepatektomie
- - - 1 Teilhepatektomie
- ... 2 Teilhepatektomien
- · - 3 Teilhepatektomien
- - - 4 Teilhepatektomien
- - - 5 Teilhepatektomien

Operationsplan siehe Abschnitt 3.4, Seite 104.

Abb. 40 und 41: Häufigkeitsverteilung der ATPase-defizienten Inseln entsprechend einzelner Größenklassen am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese bei Tieren, die in einem frühen Cancerisierungsstadium 0- bis 5-fach teilhepatektomiert wurden. (K = nicht operierte Kontrolltiere).

Die hier gewählte Darstellungsform wurde bereits auf Seite 76 für die Abbildungen 20-27 erklärt. Neben dem Mittelwert wurde hier für jede Gruppe auch der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. (Siehe auch Tab. 17, Seite 114).

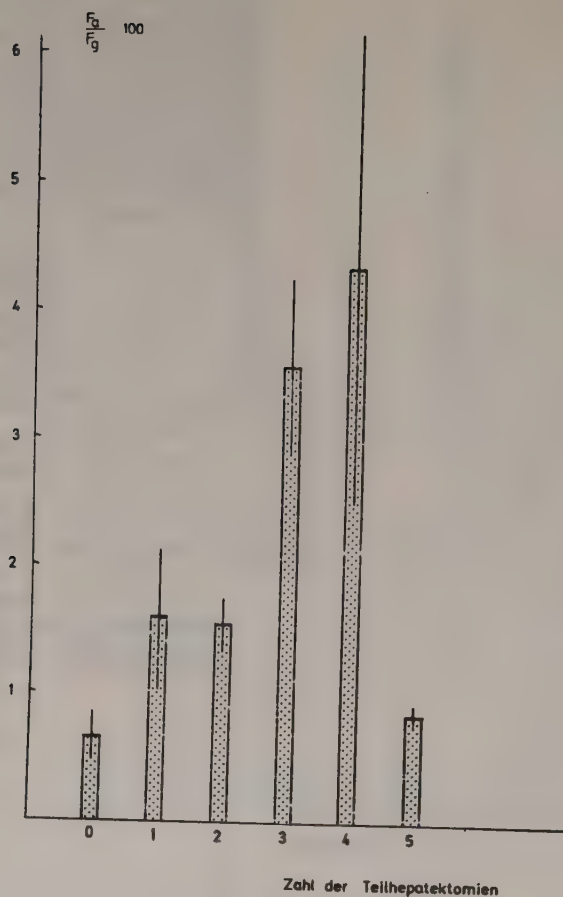


Abb. 43: Flächenhafter Anteil der ATPase-defizienten Inseln am Gesamtparenchym am 70. Tag der DÄNA-Carcinogenese bei Tieren, die in einem frühen Cancerisierungsstadium 0- bis 5-fach teilhepatektomiert wurden. (Operationsplan siehe Abschnitt 3.4, Seite 104).

Abszisse: Zahl der Teilhepatektomien
 Ordinate: Prozentualer Anteil der Inseln am Gesamtparenchym. Für jede Gruppe ist der Mittelwert mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes eingetragen.

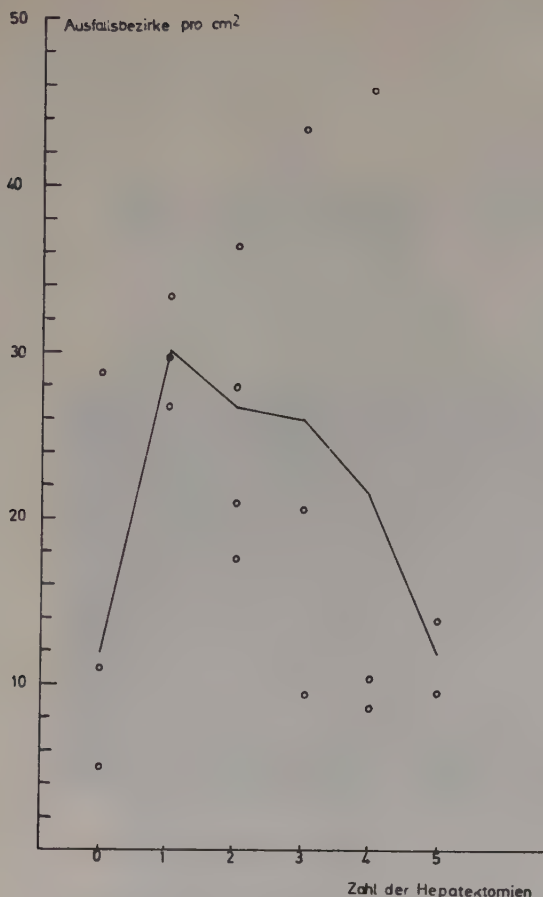


Abb. 44: Zahl der Inseln mit histochemischem Verlust der ATPase-Aktivität je Flächeneinheit (cm^2) bei Tieren, die in einem frühen Cancerisierungsstadium 0- bis 5-fach teilhepatektomiert wurden. (Operationsplan siehe Abschnitt 3.4, Seite 104).

Abszisse: Zahl der Teilhepatektomien

Ordinate: Inseln pro cm^2 . Eingetragen sind die Mittelwerte eines jeden Tieres. Die Kurve verbindet die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

V. HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE BILDER.

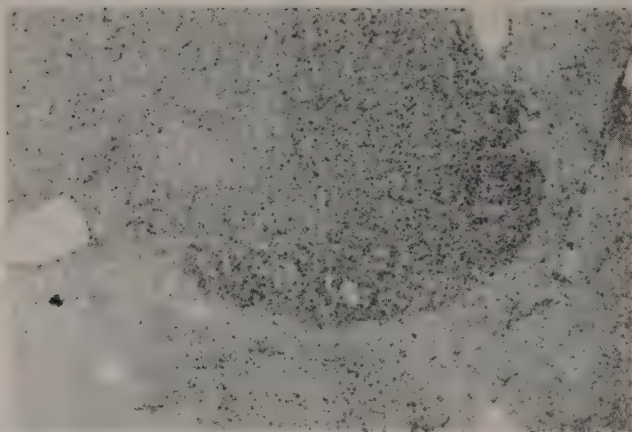


Bild 1.

Bilder 1-3: Hyperbasophiler Bezirk der ruhenden Leber am 140. Tag der DANA-Fütterung nach TdR-³H-Pulsmarkierung (Vergrößerung x60, x250, x400). Das Autoradiogramm wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Man sieht in dem Bezirk mit cytoplasmatischer Hyperbasophilie einen gegenüber der Umgebung erhöhten TdR-³H-MI und eine Zunahme kleinkerniger (diploider) Zellen. (Siehe auch S. 6 und 29).

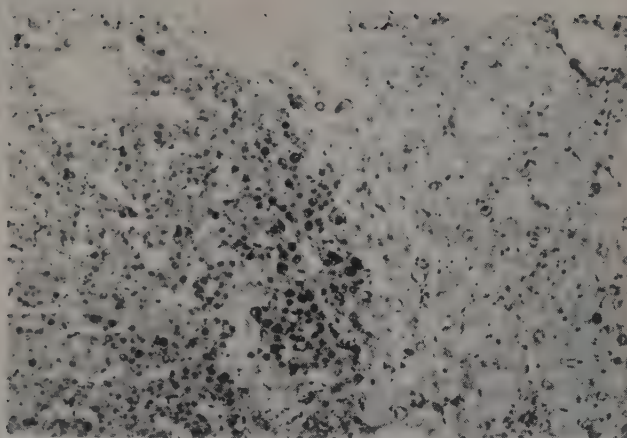


Bild 2.

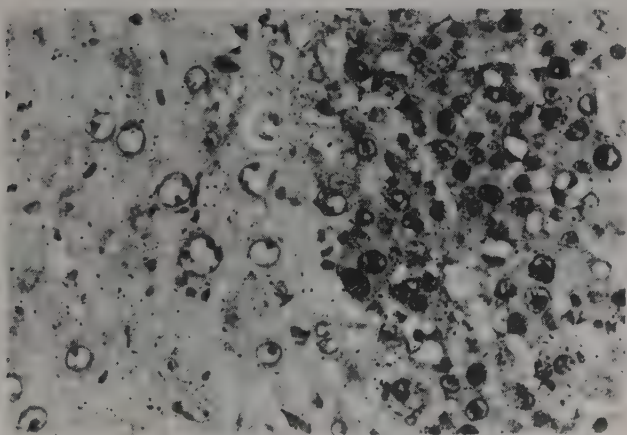


Bild 3.

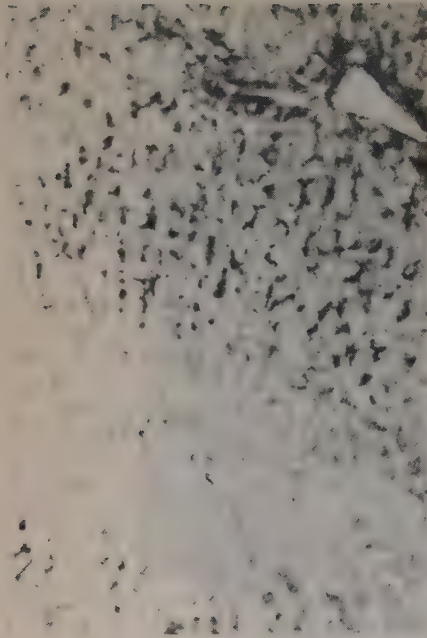


Bild 4: Histochemische ATPase-Aktivität am 10. Tag der DANA-Fütterung (Vergrößerung x250).

Während des toxischen Initialstadiums kommt es vor allem in der Zone 3 (Rappaport) des Leberläppchens zu einer Abschwächung der histochemischen ATPase-Aktivität. Daraus resultiert die vom Glisson'schen Feld (links unten) zur Zentralvene (rechts oben) hin gerichtete Abnahme der Enzymaktivität (Siehe auch S. 57-58).

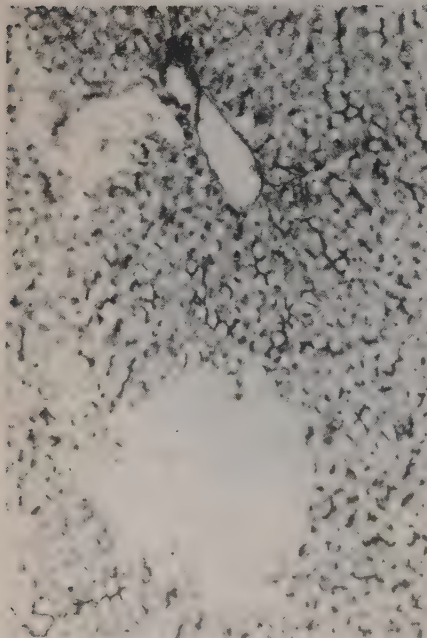


Bild 5: Histochemische ATPase-Aktivität am 90. Tag der DANA-Fütterung (Vergrößerung x250).

Der Bezirk mit völligem Verlust der histochemischen ATPase-Aktivität (Insel) ist scharf gegen das umliegende Parenchym abgegrenzt.

Die Inseln tauchen ab dem 30. Tag der DANA-Fütterung auf. Ihr Wachstum entspricht einer exponentiellen Funktion. Dies darf als Hinweis für eine clonale Genese der Inseln angesehen werden (Siehe S. 58-66).

Bild 6.

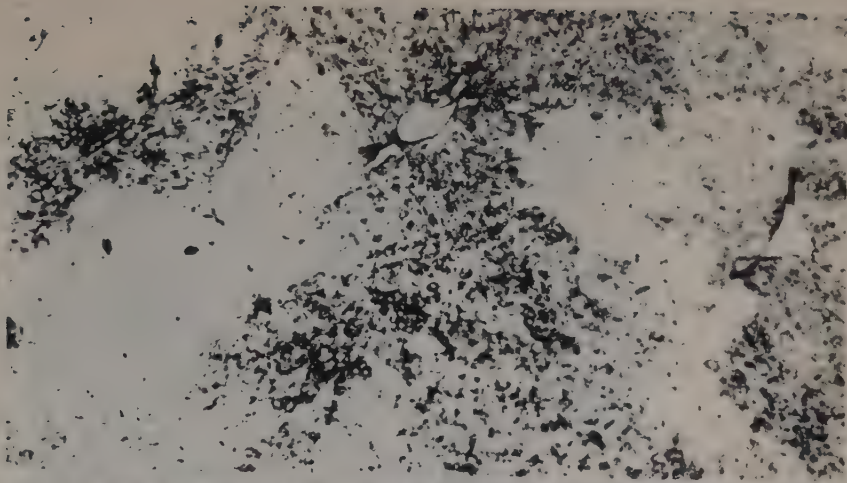


Bild 7.

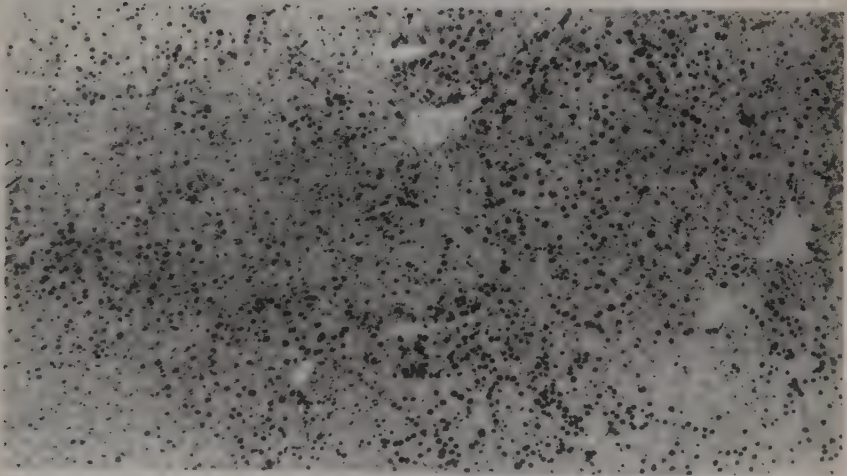
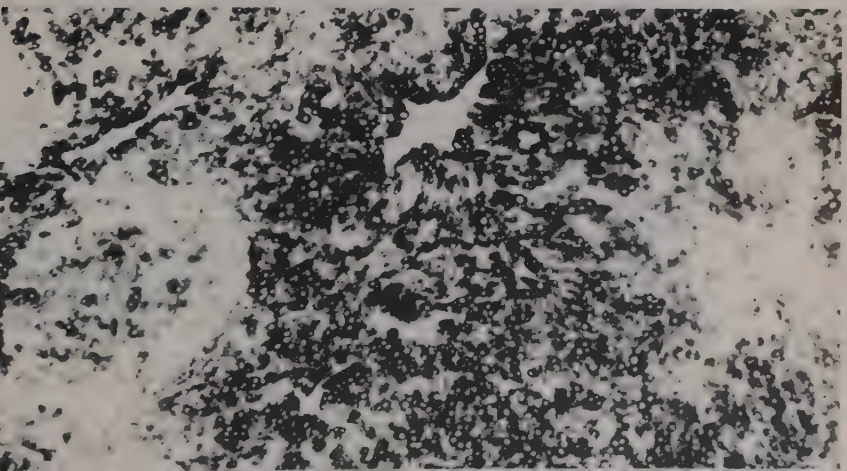


Bild 8.



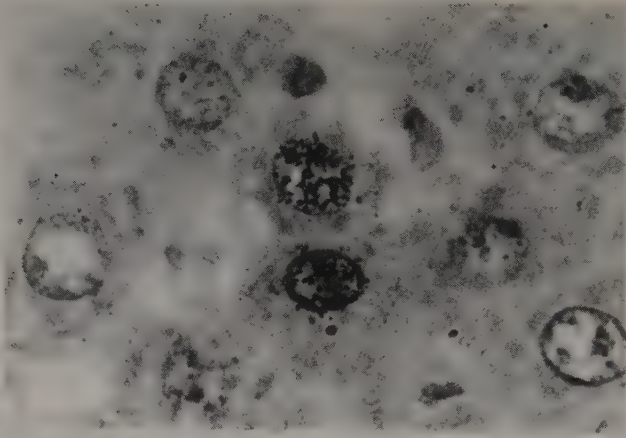


Bild 9: TdR-³H-"Dauerinfusion" (7-fache Markierung mit einem Intervall von 6 Stunden zwischen den einzelnen Injektionen) während einer unterschwelligeren Leberregeneration (nach einer ersten Leberresektion von 14,6 % und einer 8 Tage später folgenden Resektion von 17,9 %).

Trotz 37-stündiger radioaktiver Versuchszeit haben nur wenige Hepatocyten TdR-³H inkorporiert. Markierte Zellen treten häufig gepaart auf. Solche Zellpaare entstehen nach Mitosen während der radioaktiven Versuchszeit.

(Vergrößerung x1000). Siehe auch S. 111.

Bilder 6-8: Kryostatserienschnitte der Rattenleber am 90. Tag der DÄNA-Fütterung nach 7-maliger TdR-³H-Markierung mit 6-stündigem Intervall zwischen den einzelnen Injektionen (Vergrößerung x250).

Bild 6: ATPase-defiziente Inseln.

Bild 7: Autoradiogramm.

Bild 8: G-6-Pase-defiziente Inseln.

Die ATPase-defizienten Inseln sind kongruent mit den G-6-Pase-defizienten Inseln. Der TdR-³H-MI ist in Inseln und umliegenden Parenchym noch etwa gleich hoch. Die Silberkorndichte über den in den Inseln gelegenen Kernen scheint jedoch geringer zu sein als die Silberkorndichte über den Kernen des restlichen Parenchyms.

In diesen Inseln hat demnach noch keine endogene Proliferation eingesetzt. Die geringe Silberkorndichte kann aber als Hinweis für einen veränderten Zellcyclus der enzymdefizienten Hepatocyten angesehen werden (Siehe auch S.85-93).

VI. ZUSAMMENFASSUNG.

Diäthylnitrosamin (DÄNA) induziert in der Rattenleber bei einer Dosierung von 5 mg/kg/Tag nach einer Latenzzeit von etwa 130-150 Tagen Hepatome und hepatocelluläre Carcinome. Es wird vermutet, daß sich bereits in der Latenzperiode vor Manifestierung der Carcinome der Übergang von organ-spezifisch, homoiostatisch reguliertem Wachstum einzelner Zellen zur autonomen Proliferation vollzieht. Deshalb wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der DÄNA-Carcinogenese die Proliferationsaktivität der Hepatocyten mit Hilfe des ^3H -Thymidin-Markierungsindex (TdR- ^3H -MI) nach einmaliger und mehrmaliger TdR- ^3H -Markierung bestimmt. Für die einzelnen Zeitpunkte wurde einer basalen Proliferationsaktivität der ruhenden Leber eine induzierte Proliferationsaktivität der nach Teilhepatektomie regenerierenden Leber gegenübergestellt. Hiermit sollten bei fortschreitender Carcinogenese Veränderungen von basaler und induzierbarer Proliferationsaktivität und der Beginn einer endogenen Proliferationsaktivität bei einsetzendem autonomem Wachstum erfaßt werden.

Eine integrierende Bestimmung der Proliferationsaktivität der Hepatocyten unter gleichwertiger Berücksichtigung des TdR- ^3H -MI aller Parenchymbezirke sollte orientierende Vorstellungen über das Wachstumsverhalten der Hepatocyten während der DÄNA-Carcinogenese geben. Die Bestimmung des TdR- ^3H -MI in einzelnen Feldern des Leberläppchens mit unterschiedlicher Entfernung von Zentralvene und Glisson'schem Dreieck sollte Aufschluß über die Topik der DNS-synthetisierenden Zellen in verschiedenen Stadien der Carcinogenese geben.

Es lag jedoch die Vermutung nahe, daß sich Störungen in der Wachstumsregulation nicht in allen Hepatocyten gleichzeitig entwickeln, sondern daß diese Störungen auf einem veränderten biologischen Verhalten von Subpopulationen basieren. Als derartige, gegen das restliche Parenchym scharf abgesetzte Subpopulationen bieten sich makroskopisch sichtbare, hyperplastische Knötchen sowie mikroskopisch erkennbare, hyperbasophile Bezirke und Parenchymbereiche mit Verlust der histochemisch nachweisbaren Aktivität von Adenosin-Triphosphatase und Glucose-6-Phosphatase an. Diese Enzym-defizienten "Inseln" sind bereits am 30. Tag der hier gewählten Carcinogengabe erkennbar, die hyperplastischen Knötchen erscheinen erst zwischen 80. und 90. Tag, die hyperbasophilen Bezirke nicht vor dem 130.-140. Tag. Auf der Suche nach frühzeitigen Manifestationen gestörter Wachstumsregulation wurde daher die Proliferationsaktivität in den Enzym-defizienten Inseln bestimmt. Darüber hinaus wurde eine Gesetzmäßigkeit gesucht, nach der die Inseln im Leberparenchym entstehen und sich vergrößern (Wachstumskinetik der Inseln).

Eine weitere Frage war, ob Teilhepatektomien die DÄNA-Carcinogenese im Sinne eines Promotionsfaktors beschleunigen können. Da eine solche Beschleunigung nicht nur von der Art, sondern auch vom Zeitpunkt der Wachstumsanregung abhängen kann, wurden Art, Zahl und Zeitpunkt der Teilhepatektomien variiert. Eine Beeinflussung der Carcinogenese sollte nach der Überlebenszeit der Tiere und der Wachstumskinetik der Inseln beurteilt werden.

Adulte, männliche Ratten (Wistar AF/Han) erhielten 5 mg DÄNA/kg/Tag im Trinkwasser. Tiere, bei denen die regenerierende Leber untersucht werden sollte, wurden teilhepatektomiert. In der Regel wurde eine 2/3-Hepatektomie durch-

geführt. Ein Teil der Tiere wurde mehrfach (bis zu 5-fach) teilhepatektomiert. Die einzelnen Leberresektionen stellten hierbei teils unterschwellige, teils überschwellige Regenerationsreize dar. Als Kontrolltiere dienten nicht operierte Ratten.

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurden DNS-synthetisierende Zellen (S-Phasen-Zellen) mit ^3H -Thymidin markiert. Neben einmaligen Pulsmarkierungen wurden zur Bestimmung der Wachstumsfraktion mehrmalige Markierungen (7 TdR- ^3H -Markierungen mit 6-stündigen Intervallen zwischen den einzelnen Injektionen) durchgeführt. Die Autoradiogramme wurden durch Einzelzellauszählung der Hepatocyten ausgewertet. Bei den Untersuchungen zur Topik DNS-synthetisierender Zellen wurden Parenchymstreifen zwischen Zentralvene und Glisson'schem Dreieck durch ein Okularzählraster in einzelne Felder mit unterschiedlicher Entfernung von Zentralvene und Glisson'schem Dreieck unterteilt. Der TdR- ^3H -MI wurde selektiv für die einzelnen Felder bestimmt.

Der Nachweis histochemischer Aktivität von ATPase und G-6-Pase erfolgte an Kryostatserienschnitten. Die Wachstums-kinetik der enzymdefizienten Parenchym-Inseln wurde durch Bestimmung der Inselzahl sowie durch planimetrische Messung der durch ein Zeichenmikroskop projizierten Inseln untersucht.

Bei der statistischen Auswertung wurden Mittelwert, Standardabweichung und mittlerer Fehler des Mittelwertes berechnet. Die Mittelwertsdifferenzen zweier Stichproben wurden mit dem Student-t-Test auf ihre Signifikanz geprüft. Bei asymmetrischer Verteilung der Einzelwerte einer Stichprobe wurden lediglich die Mittelwerte berechnet.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

1. In der ruhenden Leber steigt der TdR-³H-MI der Hepatocyten nach Pulsmarkierung zwischen Beginn und 130. Tag der DÄNA-Fütterung langsam und kontinuierlich an. Zwischen 130. und 150. Tag kommt es zu einem steilen Anstieg des TdR-³H-MI.

2. In der regenerierenden Leber fällt der TdR-³H-MI der Hepatocyten nach Pulsmarkierung zwischen Beginn und 10. Tag der DÄNA-Fütterung ab. Einem Anstieg zu einem Plateau zwischen 30. und 90. Tag folgt ein zweiter Abfall zwischen 110. und 130. Tag. Am 140. Tag wird ein erneuter Anstieg nachweisbar.

3. Die 24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie bestimmte Topik der S-Phasen-Zellen im Leberlobulus ändert sich während der DÄNA-Carcinogenese in charakteristischer Weise: Am 10. und 30. Tag findet man nur ganz vereinzelt S-Phasen-Zellen im Läppchenzentrum, demgegenüber treten diese Zellen in der Läppchenperipherie vermehrt auf. Nach längerer DÄNA-Fütterung verlagert sich das Häufigkeitsmaximum der S-Phasen-Zellen in das Läppchenzentrum.

4. Ein DNS-Synthese-Maximum, wie es normalerweise 20-24 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie gefunden wird, tritt in der am 72. Tag der DÄNA-Fütterung teilhepatektomierten Leber nicht mehr auf.

5. Hyperbasophile Bezirke zeichnen sich nach Pulsmarkierung durch einen gegenüber der Umgebung stark erhöhten TdR-³H-MI aus.

6. Die toxisch bedingte, zentrolobulär betonte Abschwächung histochemischer Aktivität von ATPase und G-6-Pase ("Straßen") ist am 10. Fütterungstag am stärksten ausgebildet. Am 30. Tag treten in zentralen Läppchenpartien die ersten Bezirke mit Verlust der histochemischen ATPase- bzw. G-6-Pase-

Aktivität ("Inseln") auf. Mit deren Ausbreitung über das ganze Läppchen bilden sich die zentralen "Straßen" der Enzymabschwächung wieder zurück.

7. Zwischen 30. und 80. Tag der DÄNA-Fütterung nimmt die Zahl der ATPase-defizienten Inseln je Flächeneinheit einer Exponentialfunktion entsprechend zu.

8. Die Fläche der beiden größten ATPase-defizienten Inseln nimmt zwischen 30. und 100. Versuchstag exponentiell zu.

9. Der Anteil der integrierten Inselflächen an der Fläche des Gesamtparenchyms erhöht sich zwischen 30. und 80. Tag exponentiell. Zwischen 80. und 120. Tag nimmt er weiterhin zu, jedoch in geringerem Maße als vorher.

10. Die Enzymausfalls-Inseln wurden in 54 Größenklassen eingeteilt. Am 30. und 40. Tag der DÄNA-Fütterung sind nur die kleinsten Größenklassen vertreten. Zwischen 50. und 120. Tag entsprechen die Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Größenklassen einer Exponentialfunktion. Ab dem 80. Tag schließt sich dem exponentiellen Kurvenverlauf der Häufigkeitsverteilungen ein diskontinuierlicher Kurvenverlauf an: Bei Vorhandensein von Inseln einer Größenklasse fehlen die Inseln der nächsthöheren Größenklasse, während noch höhere Größenklassen wieder repräsentiert sind.

11. In der ruhenden Leber steigt der TdR-³H-MI auch nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung vom Beginn zu späteren Stadien der DÄNA-Carcinogenese hin an.

12. In den ATPase-defizienten Inseln der ruhenden Leber ist der TdR-³H-MI zwischen 50. und 80. Tag der DÄNA-Carcinogenese nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung höchstens geringgradig gegenüber dem des umliegenden Parenchyms erhöht. Ab dem 90. Tag findet man zuerst in wenigen, dann

in zunehmend mehr Inseln einen gegenüber der Umgebung erhöhten TdR-³H-MI.

13. In der regenerierenden Leber fällt der TdR-³H-MI auch nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung zwischen 10. und 30. Tag nach Fütterungsbeginn stark ab. Einer Zunahme zwischen 30. und 110. Tag folgt ein zweiter Abfall zwischen 110. und 130. Tag.

14. In der regenerierenden Leber heben sich die ATPase-defizienten Inseln bereits zwischen 50. und 100. Tag der DÄNA-Fütterung nach mehrmaliger TdR-³H-Markierung aufgrund eines erhöhten TdR-³H-MI vom umliegenden Parenchym ab. Im weiteren Verlauf der Carcinogenese sinkt der TdR-³H-MI zuerst in wenigen, dann in zunehmend mehr Inseln ab.

15. In der regenerierenden Leber scheint nach mehrfacher TdR-³H-Markierung die Silberkorndichte über den Leberzellkernen der ATPase-defizienten Inseln geringer zu sein als die über den markierten Leberzellkernen des umliegenden Parenchyms.

16. Das Wachstum der ATPase-defizienten Inseln kann zumindest durch in frühen Stadien der Latenzperiode gesetzte Teilhepatektomien, die zu einer überschwelliger Leberregeneration führen, beschleunigt werden.

17. In einem frühen Stadium der Latenzperiode gesetzte Teilhepatektomien können die Überlebenszeit der Tiere verkürzen, wenn sie eine überschwellige Leberregeneration zur Folge haben. Dieselben Teilhepatektomien scheinen jedoch - in einem späteren Stadium der Latenzperiode gesetzt - ihren Einfluß auf die Überlebenszeit der Tiere zu verlieren.

18. Auch mehrere aufeinanderfolgende Teilhepatektomien bleiben ohne Einfluß auf Überlebenszeit der Tiere und Wachstum der ATPase-defizienten Inseln, wenn sie keine überschwellige Leberregeneration zur Folge haben.

Veränderungen der DNS-Synthese-Aktivität (Proliferation) und der histochemischen Aktivität von ATPase und G-6-Pase (Funktion) in Hepatocyten, gesehen in Abhängigkeit von der Dauer der Carcinogengabe, erlauben die Unterteilung der DÄNA-Hepatocarcinogenese in mehrere Stadien:

In einem toxisch bedingten Initialstadium (bis 30. Tag) sind die basale und induzierbare Proliferationsaktivität ebenso wie die histochemische Aktivität von ATPase und G-6-Pase in zentralen und intermediären Läppchenbereichen abgeschwächt. In der Läppchenperipherie bleibt die histochemische Aktivität beider Enzyme erhalten. Gleichzeitig sind dort basale und induzierbare Proliferationsaktivität gesteigert.

Während eines zweiten Stadiums (30.-80. Tag) treten in zentralen und intermediären Läppchenabschnitten scharf begrenzte Inseln mit einem völligen Verlust der histochemisch nachweisbaren Aktivität beider Enzyme auf. Entsprechend ihrem exponentiellen Wachstum darf eine clonale Genese der Inseln angenommen werden. Die toxischen Veränderungen bilden sich in zentroazinärer Richtung zurück. Inseln und umliegendes Parenchym weisen während dieses Stadiums eine etwa gleich hohe basale Proliferationsaktivität auf. Die Inseln zeichnen sich aber durch eine gesteigerte induzierbare Proliferationsaktivität gegenüber dem umliegenden Parenchym aus. Die unterschiedliche Silberkorndichte nach mehrmaliger Markierung kann als Hinweis dafür angesehen werden, daß Zellcyclus-Phasen in den Inseln gegenüber denen des restlichen Parenchyms verändert sind. In diesem Stadium ist auch die normalerweise durch einen Wachstumsreiz auslösbare Teilsynchronisation der Hepatocyten abgeschwächt.

In einem dritten Stadium (80.-140. Tag) vergrößern sich die Inseln weiter. Basale und induzierbare Proliferationsaktivität nehmen allmählich zugunsten einer endogenen Pro-

liferation ab. Die Wachstumskinetik der Inseln wird jetzt durch Konfluktion, endogene Proliferation und zentrale Nekrosen bestimmt. Zu Beginn dieses Stadiums liegt das DNS-Synthesemaximum in zentralen und intermediären Läppchenbereichen. Mit der weiteren Ausbreitung der Inseln nimmt die DNS-Synthese in allen Läppchenbereichen gleiche Werte an.

In einem vierten Stadium (ab 140. Tag) haben die Inseln weitgehend das ganze Parenchym befallen. Die endogene Proliferation bestimmt das Wachstum der transformierten Leberzellen.

Mehrere aufeinanderfolgende Teilhepatektomien können im Sinne eines Promotionsfaktors das Inselwachstum beschleunigen. Der wechselnde Einfluß der Teilhepatektomien auf die Überlebenszeit der Tiere ist offenbar von Zeitpunkt und Ausmaß der Leberresektion nach Beginn der DÄNA-Fütterung abhängig.

LITERATURVERZEICHNIS.

- ABELL, C.W., and C. HEIDELBERGER: Interaction of Carcinogenic Hydrocarbons with Tissues. VIII. Binding of Tritium-labeled Hydrocarbons to the Soluble Proteins of Mouse Skin. *Cancer Res.* 22: 931-946 (1962).
- ALLISON, A.C., and L. MALLUCCI: Uptake of Hydrocarbon Carcinogens by Lysosomes. *Nature* 203: 1024-1027 (1964).
- AMANO, H., and R. DAOUST: The Distribution of Ribonuclease Activity in Rat Liver during Azo-Dye Carcinogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 161-164 (1961).
- AMBELLAN, E., and V.P. HOLLANDER: The Role of Ribonuclease in Regression of Lymphosarcoma P 1798. *Cancer Res.* 26: 903-909 (1966).
- ARCOS, J.C., and M. ARCOS: Molecular Geometry and Mechanisms of Action of Chemical Carcinogens. *Progr. Drug Res.* 4: 407-581 (1962).
- ARORA, D.J.S., and G. de LAMIRANDE: Ribonuclease Activity of Ribonucleoprotein Particles Isolated from Livers of Rats Fed 4-Dimethylaminoazobenzene, Primary Liver Tumors, and Novikoff Hepatoma. *Cancer Res.* 28: 255-257 (1968).
- BANERJEE, M.R.: Mitotic Blockage at G_2 after Partial Hepatectomy during 4-Dimethylaminoazobenzene Hepatocarcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 35: 585-589 (1965).
- BANNASCH, P.: Nitrosamin-induzierte Glykogenose und Geschwulstbildung in der Rattenleber. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 51: 343-349 (1967).

- BÖRNER, P., und W. GÖSSNER: Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosin-Triphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Succinodehydrogenase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Cancerogens Diäthylnitrosamin. Zschr. Naturforsch. 23 b: 1085-1091 (1968).
- BOLLUM, F.J., and V.R. POTTER: Nucleic Acid Metabolism in Regenerating Rat Liver. VI. Soluble Enzymes which Convert Thymidine to Thymidine Phosphates and DNA. Cancer Res. 19: 561-565 (1959).
- BOREK, E.: The Methylation of Transfer RNA: Mechanism and Function. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 139-148 (1963).
- BRESCIANI, F.: A Comparison of the Cell Generative Cycle in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Mammary Gland of the C3H Mouse. In: Cellular Radiation Biology, 18 th. Ann. Symp. Fundamental Cancer Res. p. 547. University of Texas, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute (1964).
- BRIÈRE, N., and R. DAOUST: Histochemical Studies on Rat Liver Proteins during 4-Dimethylaminoazobenzene Carcinogenesis. Cancer Res. 30: 1370-1375 (1970).
- BRODIE, B.B., J. AXELROD, J.R. COOPER, L. GAUDETTE, B.N. LA DU, C. MITOMA, and S. UDENFRIEND: Detoxication of Drugs and Other Foreign Compounds by Liver Microsomes. Science 121: 603-604 (1955).
- BROOKES, P., and P.D. LAWLEY: Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin: Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and their Binding to Deoxyribonucleic Acid. Nature 202: 781-784 (1964).
- BROUWERS, J.A.J., and P. EMMELOT: Microsomal N-Demethylation and the Effect of the Hepatic Carcinogen Dimethylnitrosamine on Amino Acid Incorporation into the Proteins

- of Rat Livers and Hepatomas. *Exp. Cell Res.* 19: 467-474 (1960).
- BUCHER, N.L.R.: Regeneration of Mammalian Liver. *Int. Rev. Cytol.* 15: 245-300 (1963).
- BÜCHNER, F.: Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner morphologischer Methoden. *Vern. Dtsch. Ges. Path.* 45: 37-59 (1961).
- BUSCH, H., J.L. HODNETT, H.P. MORRIS, R. NEOGY, K. SMETANA, and T. UNUMA: ^{32}P Nucleotide Composition of Nuclear and Nucleolar RNA of Morris Hepatomas. *Cancer Res.* 28: 672-683 (1968).
- CAMPBELL, P.N., and J.W. HALLIDAY: The Conversion of Glucose into Alanine and Glutamic Acid by Rat Liver, Liver Tumor, and Kidney in Vivo. *Biochem. J.* 65: 28-33 (1957).
- CHAKRAVORTY, A.K., and H. BUSCH: Alkaline Ribonuclease and Ribonuclease Inhibitor in Nuclear and Nucleolar Preparations from Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Res.* 17: 781-792 (1967).
- CHIUQUINE, A.D.: Further Studies on the Histochemistry of Glucose-6-Phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 3: 471-478 (1953).
- CÔTÉ, J., W. OEHLERT, und F. BÜCHNER: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Kanzerisierung der Leberparenchymzelle der Ratte durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. Path. Anat.* 127: 450-473 (1962).
- CRADDOCK, V.M.: Stability of Desoxyribonucleic Acid Methylated in the Intact Animal by Administration of Dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 111: 497-502 (1969).
- CRADDOCK, V.M., and P.M. MAGEE: Analysis of Bases of Rat Liver Nucleic Acids after Administration of Carcinogen Dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 100: 724-728 (1966).

- CRADDOCK, V.M., and P.N. MAGEE: Methylation of Liver DNA in the Intact Animal by the Carcinogen Dimethylnitrosamine during Carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 95: 677-678 (1965).
- DAOUST, R.: Cellular Populations and Nucleic Acid Metabolism in Rat Liver Parenchyma during Azo Dye Carcinogenesis. *Canadian Cancer Conference* 5: 225-239 (1963).
- DAOUST, R., and H. AMANO: Ribonuclease and Desoxyribonuclease Activities in Experimental and Human Tumors by the Histochemical Substrate Film Method. *Cancer Res.* 23: 131-134 (1963).
- DAOUST, R., and A. CANTERO: The Distribution of Deoxyribonuclease in Normal, Cirrhotic, and Neoplastic Rat Livers. *J. Histochem. Cytochem.* 7: 139-143 (1959).
- DE DUVE, C.: Lysosomes, a New Group of Cytoplasmic Particles. In: *Subcellular Particles* pp. 128-159. Edited by Hayashi, T., New York (1959).
- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANCOVIC, und D. SCHMÄHL: Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Zschr. Krebsforsch.* 69: 103-201 (1967).
- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL, und M. MÜLLER: Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Naturwissenschaften* 48: 134-135 (1961).
- DRUCKREY, H., A. SCHILDBACH, D. SCHMÄHL, R. PREUSSMANN, und S. IVANCOVIC: Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittel-Forsch.* 13: 841 (1963).
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, R. PREUSSMANN, und S. IVANCOVIC: Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Zschr. Krebsforsch.* 66: 1-10 (1964).

- EDWARDS, J.L., S.W. SMITH, E.R. WESTMARK, and P.M. YOUCIS: Interrelations of DNA Synthesis and Cell Division in Normal and Regenerating Liver. Fed. Proc. 18: 475 (1959).
- EPSTEIN, S., N. ITO, L. MERKOW, and E. FARBER: Cellular Analysis of Liver Carcinogenesis: The Induction of Large Hyperplastic Nodules in the Liver with 2-Fluorenylacetyl-amide or Ethionine and Some Aspects of their Morphology and Glycogen Metabolism. Cancer Res. 27: 1702-1711 (1967).
- FABRIKANT, J.I.: The Kinetics of Cellular Proliferation in Regenerating Liver. J. Cell Biol. 36: 551-565 (1968).
- FARBER, E., J. Mc CONOMY, B. FRANZEN, F. MARROQUIN, G.A. STEWART, and P.N. MAGEE: Interaction between Ethionine and Rat Liver Ribonucleic Acid and Protein. Cancer Res. 27: 1761-1772 (1967).
- FIALA, S., and A.E. FIALA: Intracellular Localisation of Carcinogen and its Relationship to the Mechanism of Carcinogenesis in Rat Liver. Brit. J. Cancer 13: 236-250 (1959).
- FRIEDMAN, M., K.H. SHULL, and E. FARBER: Highly Selective in Vivo Ethylation of Rat Liver Nuclear Protein by Ethionine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34: 857 (1969).
- FRIEDRICH-FREKSA, H.: Kurzmitteilungen in: Max-Planck Gesellschaft 1968-1969 12: 659 (1970).
- FRIEDRICH-FREKSA, H., G. PAPADOPULU, und W. GÖSSNER: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabreichung von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72: 240-253 (1969 a).
- FRIEDRICH-FREKSA, H., W. GÖSSNER, und P. BÖRNER: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergabe von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72: 226-239 (1969 b).

FRIEDRICH-FREKSA, H., and M. HOFFMANN: Immunological Defense against Preneoplastic Stages of Diethylnitrosamine-induced Carcinomas in Ratliver. *Nature* 223: 1162-1163 (1969).

FRINDEL, E., E. MALAISE, and M. TUBIANA: Cell Proliferation Kinetics in Five Human Solid Tumors. *Cancer Res.* 22: 611-620 (1968).

GLINOS, A.D.: The mechanism of Liver Growth and Regeneration. In: *The Chemical Basis of Development* (W.D. Mc Elroy and B. Glass, eds.), p. 813. Johns Hopkins Press, Baltimore (1958).

GODWIN, E.L.R., K.R. REES, and J.S. VARCOE: Nuclear RNA Synthesis in Rat Liver during the Early Stages of Chemical Carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 21: 166-173 (1967).

GÜSSNER, W., und H. FRIEDRICH-FREKSA: Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamin. *Zschr. Naturforsch.* 19 b: 862 (1964).

GRISHAM, J.W.: Inhibitory Effect of Tritiated Thymidine on Regeneration of the Liver in the Young Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105: 555-558 (1960).

GRISHAM, J.W.: A Morphologic Study of DNA-Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver: Autoradiography with Thymidine- H^3 . *Cancer Res.* 22: 842-849 (1962).

GRUNDMANN, E., und H. SIEBURG: Die Histogenese und Cyto-genese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. *Beitr. Path. Anat.* 126: 58-112 (1962).

GUELSTEIN, V.I.: Peculiarities of Mouse Liver Regeneration in the Process of Experimental Carcinogenesis. *Vop. Onkol.* 9: 61-68 (1963).

- HADJIOLOV, A.A., und Z.S. TENTSCHEWA: Über die Veränderungen der Nukleinsäuren in der Leber von Ratten bei der Cancergenese durch 4-Dimethylaminoazobenzol. *Zschr. Krebsforsch.* 62: 361-369 (1958).
- HADJIOLOV, D., und A. DIKOW: Die Glucose-6-Phosphatase und Aldolase in primären, Diäthylnitrosamin-induzierten Lebertumoren. *Zschr. Krebsforsch.* 74: 48-54 (1970).
- HARKNESS, R.D.: Regeneration of the Liver. *Brit. Med. Bull.* 13: 87-93 (1957).
- HEIDELBERGER, C.: The Relation of Protein Binding to Hydrocarbon Carcinogenesis. In: *Ciba Found. Symp. on Carcinogenesis. Mechanisms of Action*, pp. 179-192 (1959).
- HEINE, W.D., und E. STÖCKER: Zum Proliferationsmodus der Rattenleber nach modifizierter Teilhepatektomie. *Klin. Wschr.* 40: 395-396 (1968).
- HEININGER, H.J., L.E. FEINENDEGEN, and G. FRIEDRICH: Local Reutilization of Thymidine in Rapidly Proliferating Tissue of the Normal Mouse. (in press).
- HEMPEL, K.: Analyse des Zellcyclus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction". *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 1: 15-30 (1968).
- HEMPEL, K., K.I. LENNARTZ, und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweiß-Stoffwechsel im Kern und Cytoplasma der normalen und durch Buttergelb cancerisierten Leberzelle. *Beitr. path. Anat.* 126; 381-394 (1962).
- HIATT, H.H., and T.B. BOJARSKI: Stimulation of Thymidilate Kinase Activity in Rat Tissues by Thymidine Administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2: 35-39 (1960).

- HIGGINS, G.M., and R.M. ANDERSON: Experimental Pathology of the Liver of the White Rat Following Partial Surgical Removal. Arch. Path. 12: 186-202 (1931).
- HOBRIK, H.P., und E. GRUNDMANN: Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. Beitr. path. Anat. 127: 25-48 (1962).
- HOFFMANN, M.: Kritische Zeitabhängigkeit des Einflusses der Leberregeneration auf die Carcinogenese der Rattenleber. Zschr. Naturforsch. 25 b: 434 (1970).
- INGLE, D.J., and L.B. BAKER: Histology and Regenerative Capacity of Liver Following Multiple Partial Hepatectomies. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 95: 813-815 (1957).
- KIELLEY, R.K.: Particle-bound Thymidylate Kinase in Mouse Liver, a Possible Factor in the Control of DNA-Synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10: 249-253 (1963).
- KNECHT, M.: Untersuchungen über eine mikrosomale N-Demethylase in verschiedenen Organen der Ratte in vitro. Zschr. Naturforsch. 21 b: 799-801 (1966).
- KRÖGER, H., und H. KESSEL: Enzym-Induktion und Nukleinsäurestoffwechsel unter dem Einfluß organspezifischer Nitrosamine. Zschr. Naturforsch. 23 b: 1240-1244 (1968).
- KRÖGER, H., und T. LÜCKING: Nukleinsäurestoffwechsel der Rattenleber während der Carcinogenese mit N-Nitrosomorpholin. Zschr. Naturforsch. 22 b: 967-971 (1967).
- KUNZE, E., und A. SCHAUER: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen an Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasenpapillomen der Ratte. Zschr. Krebsforsch. 75: 146-160 (1971).
- KUNZE, E., A. SCHAUER, und M.A. AZAMI: Präcanceröse Enzymdefekte der Rattenleber durch Dibutylnitrosamin und 1,2-Dimethylhydralazin. Naturwissenschaften 57: 199 (1970).

- LAWLEY, P.D., P. BROOKES, P.N. MAGEE, V.M. CRADDOCK, and P.F. SWANN: Methylated Bases in Liver Nucleic Acids from Rats Treated with Dimethylnitrosamine. *Biochim. Biophys. Acta* 157: 646-648 (1968).
- LEEVEY, C.M.: Observations on Hepatic Regeneration in Man. *Advances in international medicine* 13: 97 (1967).
- MAC DONALD, R.A.: Experimental Carcinoma of the Liver. "Regeneration" of Liver Cells in Premalignant Stages. *Amer. J. Path.* 39: 209-220 (1961).
- MAGEE, P.N.: Toxic Liver Injury. Inhibition of Protein Synthesis in Rat Liver by Dimethylnitrosamine in Vivo. *Biochem. J.* 70: 606-611 (1958).
- MAGEE, P.N.: Biochemical and Pathological Mechanisms in Experimental Liver Cancer. *Sci. Basis Med. Ann. Rev.* 172-202 (1962).
- MAGEE, P.N., and E. FARBER: Toxic Liver Injury and Carcinogenesis: Methylation of Rat-Liver Nucleic Acids by Dimethylnitrosamine in Vivo. *Biochem. J.* 83: 114-124 (1962).
- MAGEE, P.N., and T. HULTIN: Toxic Liver Injury and Carcinogenesis: Methylation of Proteins of Rat-Liver Slices by Dimethylnitrosamine in Vitro. *Biochem. J.* 83: 106-114 (1962).
- MAINI, M.M., and H.F. STICH: Chromosomes of Tumor Cells. III. Unresponsiveness of Precancerous Hepatic Tissues and Hepatomas to a Mitotic Stimulus. *J. Nat. Cancer Inst.* 28: 753-762 (1962).
- MARQUARDT, H., F.K. ZIMMERMANN, und R. SCHWAIGER: Nitrosamide als mutagene Agentien. *Naturwissenschaften* 50: 625 (1963).

- MENDELSON, M.L.: Autoradiographic Analysis of Cell Proliferation in Spontaneous Breast Cancer of C3H-Mouse. III. The Growth Fraction. J. Nat. Cancer Inst. 28: 1015-1029 (1962 a).
- MENDELSON, M.L.: Chronic Infusion of Tritiated Thymidine into Mice with Tumors. Science 135: 213-215 (1962 b).
- MENDELSON, M.L.: The Kinetics of Tumor Cell Proliferation. In: M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute (eds.). Cellular Radiation Biology. Baltimore, pp. 498-513 (1965).
- MEYER-BERTENRATH, J.G.: Störungen der Ribosomenfunktion während einer exogen induzierten Carcinogenese. Zschr. Naturforsch. 22 b: 660-662 (1967).
- MEYER-BERTENRATH, J.G., und U. DEGE: Zur Wirkung des Nitrosomorpholins auf den RNS-Stoffwechsel der Rattenleber. Zschr. Naturforsch. 22 b: 169-172 (1967).
- MILLER, J.A., and E.C. MILLER: The Carcinogenic Aminoazo Dyes. Advances Cancer Res. 1: 339-396 (1953).
- MÖLBERT, E., K. HILL, und F. BÜCHNER: Die Cancerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthylnitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild. Beitr. path. Anat. 126: 218-242 (1962).
- MOLNAR, F., and R. DAOUST: Nucleoplasmatic Ratios in Different Populations of Rat Liver Parenchymal Cells during Azo Dye Carcinogenesis. Cancer Res. 25: 1213-1218 (1965).
- NAGAO, M., and Y. ICHIKAWA: Systemic Effect of Mouse Leukemia on RNase and its Inhibitor of Host Liver and Spleen. Gann 60: 279-285 (1969).
- NOVIKOFF, A.B., and E. ESSNER: The Liver Cell: Some New Approaches to its Study. Amer. J. med. 29: 102-131 (1960).
- OEHLERT, W., und P. BLOCK: Der Mechanismus und zeitliche Ablauf der reparativen Regeneration in Geweben mit post-

und intermitotischem Zellbestand. Verh. Dtsch. Ges. Path.
46: 333-340 (1962).

OEHLERT, W., and J. CÔTÉ: Developmental Stages of Mouse Squamous Cell Carcinoma: Autoradiographic Investigations Using H^3 -Thymidine, H^3 -Cytidine, and H^3 Leucine. In: Proceedings on an International Conference on the Morphological Precursors of Cancer. Edited by Severi, L., pp. 541-548 (1962).

OEHLERT, W., J. CÔTÉ, und F. BÜCHNER: Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung. Beitr. path. Anat. 125: 280-303 (1961).

OEHLERT, W., W. HÄMMERLING, und F. BÜCHNER: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. Beitr. path. Anat. 120: 91-112 (1962).

OPIE, E.L.: Mobilization of Basophilic Substance (Ribonucleic Acid) in the Cytoplasm of Liver Cells with the Production of Tumors by Butter Yellow. J. Exp. Med. 84: 91-106 (1946).

PACK, G.T., A.H. ISLAMI, J.C. HUBBART, and R.D. BRASFIELD: Regeneration of Human Liver after Major Hepatectomy. Surgery 52: 617-623 (1962).

PITOT, H.C., and C. HEIDELBERGER: Metabolic Regulatory Circuits and Carcinogenesis. Cancer Res. 23: 1694-1699 (1963).

POST, J., CHENG-YA HUANG, and J. HOFFMAN: The Replication Time and Pattern of the Liver Cell in the Growing Rat. J. Cell Biol. 18: 1-12 (1963).

POST, J., and J. HOFFMAN: The Replication Time and Pattern of Carcinogen-Induced Hepatoma Cells. J. Cell Biol. 22: 341-350 (1964).

POTTER, V.R.: The Present Status of the Deletion Hypothesis. Univ. Mich. M. Bull. 23: 401-412 (1957).

PRICE, J.M., J.W. HARMAN, E. MILLER, and J.A. MILLER: Progressive Microscopic Alterations in the Livers of Rats Fed the Hepatic Carcinogens 3'-Methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and 4'-Fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 12: 192-200 (1952).

QUASTLER, H., and F.G. SHERMAN: Cell Population Kinetics in the Intestinal Epithelium of the Mouse. Exp. Cell Res. 17: 420-438 (1959).

RABES, H.: Bestimmung der Zellzyklusphasen in heterogenen Tumorzellpopulationen in vivo. Zschr. Naturforsch. 24 b: 468 (1969).

RABES, H., und B. JANTSCH: Proliferationskinetik der Hepatocyten in primären Leberkulturen. Zschr. Zellforsch. 112: 414-429 (1971).

RABES, H., und H.V. TUCZEK: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6: 302-312 (1970).

RABES, H., R. HARTENSTEIN, und P. SCHOLZE: Hemmung der Proliferationsaktivität partiell resezierter Leber durch Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 73: 239-241 (1970 a).

RABES, H., R. HARTENSTEIN, and P. SCHOLZE: Specific Stages of Cellular Response to Homeostatic Control during Diethylnitrosamine-Induced Liver Carcinogenesis. Experientia 26: 1356-1359 (1970 b).

RABES, H., P. SCHOLZE, und R. HARTENSTEIN: Spezifische Stadien im Wachstumsverhalten präneoplastischer Zellen während der Cancerogenese. Verh. Dtsch. Ges. Path. 54: 428-433 (1970 c).

- RABES, H., P. SCHOLZE, und R. HARTENSTEIN: Wirkung wiederholter Leberresektionen auf die Diäthylnitrosamin-induzierte Carcinogenese. Zschr. Naturforsch. 25 b: 896 (1970 d).
- RABES, H., R. HARTENSTEIN, and W. RINGELMANN: DNA Synthesis in Rat Liver during Early Stages of Azo Dye-induced Hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 32: 83-89 (1972).
- RABES, H., R. WIRSCHING, und H.V. TUCZEK: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwissenschaften 59: 221-222 (1972 a).
- RAJEWSKY, M.F.: Changes in DNA Synthesis and Cell Proliferation during Hepatocarcinogenesis by Diethylnitrosamine. Europ. J. Cancer 3: 335-342 (1967).
- RAJEWSKY, M.F., W. DAUBER, and H. FRANKENBERG: Liver Carcinogenesis by Diethylnitrosamine in the Rat. Science 152: 83-85 (1966).
- RAPPAPORT, A.M.: Acinar Units and the Pathophysiology of the Liver. In: The Liver. Vol I (Ch. Rouiller ed.) New York and London, Academic Press (1963).
- REUBER, M.D.: Development of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Liver in Male Rats Given 0,025 Percent N-2-Fluorenyl-diacetamide. J. Nat. Cancer Inst. 34: 697-723 (1965).
- REUBER, M.D., and H.I. FIRMINGER: Morphologic and Biologic Correlation of Lesions Obtained in Hepatic Carcinogenesis in AxC Rats Given 0,025 Percent N-2-Fluorenyl-diacetamide. J. Nat. Cancer Inst. 31: 1407-1430 (1963).
- RICHTER, K.M., and V.K.U.V. SAINI: Fluorescence Studies on the in Vitro Intracellular Accumulation of Carcinogenic Hydrocarbons. Amer. J. Anat. 107: 209-235 (1960).

- ROBERTS, J.J., and G.P. WARWICK: The Covalent Binding of Metabolites of Dimethylaminoazobenzene, beta-Naphthylamine, and Aniline to Nucleic Acids in Vivo. *Int. J. Cancer* 1: 179-196 (1966).
- RONDONI, P.: Some Aspects of Carcinogenesis. *Advances Cancer Res.* 3: 171-221 (1955).
- RUSCH, H.P.: Carcinogenesis: A Facet of Living Processes. *Cancer Res.* 14: 407-417 (1954).
- SCHAUER, A.: Histochemische und biochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin an der Rattenleber. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50: 344-347 (1966).
- SCHAUER, A., und E. KUNZE: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. *Zschr. Krebsforsch.* 70: 252-266 (1968).
- SCHAUER, A., E. KUNZE, B. BURKHARD, und J. ROSNITSCHKE: Beeinflussung der Cancerisierung der Rattenleber durch Steroidhormone. *Naturwissenschaften* 12: 676-677 (1970).
- SCHERER, E., and M. HOFFMANN: Probable Clonal Genesis of Cellular Islands Induced in the Rat Liver by Diethylnitrosamine. *Europ. J. Cancer* 7: 369-371 (1971).
- SCHMÄHL, D., and H. OSSWALD: Carcinogenesis in Different Animal Species by Diethylnitrosamine. *Experientia* 23: 297-299 (1967).
- SCHMÄHL, D., H. OSSWALD, und K. GOERTTLER: Cancerogene Wirkung von Diäthylnitrosamin bei Schweinen. *Zschr. Krebsforsch.* 71: 183-185 (1968).
- SCHMÄHL, D., H. OSSWALD, und U. MOHR: Hepatotoxische Wirkung von Diäthylnitrosamin bei Schweinen. *Naturwissenschaften* 54: 341 (1967).

- SCHMÄHL, D., R. PREUSSMANN, H. HAMPERL: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissenschaften* 47: 89 (1960).
- SCHUBERT, J.C.F., und H. RINNEBERG: Der zytochemische Nachweis von Adenosintriphosphat spaltenden Fermenten bei ph 7,2 in menschlichen Knochenmarksausstrichen. *Blut* 8: 282-293 (1962).
- SHUBIK, P., and J.L. HARTWELL: Survey of Compounds which Have been Tested for Carcinogenic Activity. U.S. Public Health Service 149. (Suppl. I), 1957.
- SIMARD, A., G. COUSINEAU, and R. DAoust: Variations in the Cell Cycle during Azo Dye Hepatocarcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 41: 1257-1263 (1968).
- SIMPSON, G.E.C., and E.S. FINCKH: The Pattern of Regeneration of Rat Liver after Repeated Partial Hepatectomies. *J. Pathol. Bacteriol.* 86: 361-373 (1963).
- SLOANE, G.H.J., and C.N. LOESER: Spectroscopic Analysis of Carcinogenic Hydrocarbons in Biologic Interaction in Vivo and in Vitro. *Cancer Res.* 23: 1555-1565 (1963).
- SNEIDER, T.W., and V.R. POTTER: Deoxycytidylate Deaminase and Related Enzymes of Thymidine Triphosphate Metabolism in Hepatomas and Precancerous Rat Liver. *Advances Enzyme Regulation* 7: 375-394 (1969).
- SOROF, S., P.P. COHEN, E.C. MILLER, and J.A. MILLER: Electrophoretic Studies on the Soluble Proteins from Livers of Rats Fed Aminoazo Dyes. *Cancer Res.* 11: 383-387 (1951).
- SOROF, S., E.M. YOUNG, and P.L. FETTERMAN: Electrophoretic Distribution of Derivates of 2-Acetylaminofluorene-9-C¹⁴ Bound to Soluble Proteins of Rat Liver in Vivo. *Exp. Cell Res.* 20: 253-255 (1960).
- SPORN, M.B., and C.W. DINGMAN: 2-Acetamidofluorene and 3-Methylcholanthrene: Differences in Binding to Rat Liver

- Deoxyribonucleic Acid in Vivo. *Nature* 210: 531-532 (1966).
- STARIKOVA, V.B., and J.M. VASILIEV: Action of 7,12-Dimethylbenzanthracene on the Mitotic Activity of Normal and Malignant Rat Fibroblasts. *Nature* 195: 42-43 (1962).
- STITNIMANKARN, T., and K. THAKERNGPOL: Enzyme Histochemical Study of Primary Hepatic Carcinoma in Thailand. *Cancer* 25: 1064-1067 (1969).
- STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50: 53-74 (1966).
- STÖCKER, E., und U. PFEIFER: Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymin an der regenerierenden Rattenleber. *Zschr. Zellforsch.* 79: 374-388 (1967).
- STÖCKER, E., E. TEUBNER, und S. ROSENBUSCH: Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 48: 295-299 (1964).
- SWANN, P.F., and P.N. MAGEE: Nitrosamine-Induced Carcinogenesis: The Alkylation of Nucleic Acids of the Rat by N-Methyl-N-Nitrosurea, Dimethylnitrosamine, Dimethylsulfate and Methylmethanesulphonate. *Biochem. J.* 110: 39-47 (1969).
- SYDOW, G., und F. FEY: Über die Glykogenose in der Rattenleber nach Einwirkung von Diäthylnitrosamin. *Acta biol. med. germ.* 23: 9-13 (1969).
- TAPER, H.S., L. FORT, and J.M. BRUCHER: Histochemical Activity of Alkaline and Acid Nucleases in the Rat Liver Parenchyma during N-Nitrosomorpholine Carcinogenesis. *Cancer Res.* 31: 913-916 (1971).
- THEODOSSIOU, A., P. BANNASCH, und W. REUSS: Glykogen und endoplasmatisches Retikulum der Leberzelle nach hohen Dosen des Carcinogens N-Nitrosomorpholin. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 7: 126-146 (1971).
- VOLM, M., und R. SÜSS: Einbau von ^3H -Thymin, ^3H -Uridin und ^3H -Leucin in Tetrahymena, L-Zellen und Leber-Explantate un-

ter Einfluß von carcinogenen Nitrosaminen und Nitrosamiden. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 261: 353-359 (1968).

WACHSTEIN, M.: Enzymatic Histochemistry of the Liver. Gastroenterology 37: 525-537 (1959).

WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: The Histochemical Distribution of 5-Nucleotidase and Unspecific Alkaline-Phosphatase in the Testicle of Various Species and in Two Human Seminomas. J. Histochem. Cytochem. 2: 137 (1954).

WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Histochemistry of Hepatic Phosphatases at a Physiologic ph. Amer. J. Clin. Path. 27: 13-23 (1957).

WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Method for Glucose-6-Phosphatase. In: Pearse: Histochemistry (Second Ed.) 1960.

WACHSTEIN, M., E. MEISEL, and C. FALCON: Enzymatic Histochemistry in the Experimentally Damaged Liver. Amer. J. Path. 40: 219-242 (1962).

WEILER, E.: Die Änderung der serologischen Organspezifität beim Buttergelbtumor der Ratte im Vergleich zu normaler Leber. Zschr. Naturforsch. 7 b: 324-326 (1952).

WEINBREN, K.: Regeneration of the Liver. Gastroenterology 37: 657-668 (1959).

WIKMAN, J., E. HOWARD, E. YAZDI, and H. BUSCH: Structural Differences in Nucleolar and Ribosomal RNA's of Hepatomas and Normal Liver. 10. Int. Cancer Congr. Abstr. No. 428 (1970).

YAZDI, E., T.S. RO-CHOI, J. WIKMAN, Y.C. CHOI, and H. BUSCH: ³²P Distribution in Oligonucleotides of Rapidly Sedimenting Nucleolar RNA's of Hepatomas and Normal Rat Liver. Cancer Res. 29: 1755-1762 (1969).

ABKÜRZUNGEN.

AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPase	Adenosin-Triphosphatase
DAB	Dimethylaminoazobenzol
DÄNA	Diäthylnitrosamin
DMNA	Dimethylnitrosamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
FAA	Fluorenylacetamid
G ₀ -Phase	Phase, in der sich postmitotische Zellen befinden
G ₁ -Phase	Praesynthetische Ruhephase
G ₂ -Phase	Postsynthetische, praemitotische Ruhephase
G-6-Pase	Glucose-6-Phosphatase
GF	Wachstumsfraktion (growth fraction)
m-RNS	Messenger-Ribonukleinsäure
r-RNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
s-RNS	Soluble Ribonukleinsäure
t-RNS	Transfer-Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S-Phase	DNS-Synthesephase
t _C	Zellcycluszeit
t _S	Dauer der DNS-Synthese-Phase
TdR- ³ H-MI	³ H-Thymidin-Markierungsindex

Zur Statistik:

n	Stichprobenumfang
s	Standardabweichung der Stichprobe
s $\bar{x}$	Mittlerer Fehler des Mittelwertes einer Stichprobe
$\bar{x}$	Mittelwert einer Stichprobe.

Lebenslauf.

Am 12. April 1945 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Friedrich Scholze und seiner Ehefrau Eva, geb. Rehwald in Teplitz-Schönau geboren. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Heidenheim/Brenz und Neu-Ulm/Donau, anschließend das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Neu-Ulm/Donau und Stuttgart. Am Friedrich-Eugensgymnasium in Stuttgart legte ich im März 1965 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1965 begann ich an der Universität Tübingen das Medizinstudium. Dort legte ich im Herbst 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach zwei klinischen Semestern in Hamburg und weiteren vier klinischen Semestern an der Ludwig-Maximilians-Universität in München bestand ich im Frühjahr 1971 in München das medizinische Staatsexamen. Im letzten Jahr war ich als Medizinalassistent am Pathologischen Institut und in der I. Medizinischen Klinik der Universität München sowie am Städt. Krankenhaus München-Schwabing tätig.

